
Jean-Claude CALLEN

EXPRESS

# Biologie cellulaire

## en 30 fiches

Comprendre et s'entraîner facilement

DUNOD

Jean-Claude CALLEN

# Biologie cellulaire en 30 fiches

DUNOD

Consultez nos parutions sur dunod.com





ISBN 978-2-10-054193-5

# Avant-propos

Cet ouvrage est destiné aux étudiants en Biologie (L1 et L2 SV). Comme tous les volumes de cette collection, il vise à leur faire acquérir les bases d'une véritable démarche expérimentale en Biologie Cellulaire. Longtemps réduite à la seule description des structures cellulaires : la Cytologie, cette discipline s'est enrichie, au cours du temps, des méthodes de la Biochimie, de la Biophysique, de la Physiologie Cellulaire et plus récemment de la Biologie Moléculaire. Il suffit simplement de feuilleter un journal scientifique dédié à la Biologie Cellulaire moderne pour se convaincre de la multiplicité des approches qui caractérisent cette discipline.

Afin de coller au plus près à l'actualité de la Recherche, l'enseignement universitaire se doit donc de former les étudiants aux démarches et aux outils les plus récents ; il est bien loin le temps où les séances de Travaux Dirigés consistaient à reproduire le plus fidèlement possible des clichés de Microscopie Électronique ! Actuellement, il est indispensable qu'un étudiant en Biologie Cellulaire connaisse un grand nombre de techniques, de plus en plus sophistiquées. Et si le fractionnement cellulaire et l'électrophorèse ne doivent plus avoir de secrets pour lui, il lui faut aussi maîtriser les bases de l'immunocytochimie et de l'hybridation *in situ*, connaître le principe d'un microscope confocal et d'un trieur de cellules, mais aussi savoir construire un protocole utilisant un système de traduction *in vitro* ou la GFP.

C'est dans cet esprit et avec cet objectif que cet ouvrage est construit. Il est divisé en 30 fiches de 5 pages, couvrant 10 grands thèmes classiques de la Biologie Cellulaire. Chacune d'elles inclut une page de rappels de notions indispensables et une page décrivant une technique précise, en rapport (dans la mesure du possible) avec le sujet de la fiche ; trois pages sont donc consacrées à des exercices semblables à ceux effectués dans des Travaux Dirigés. Sur les 62 exercices proposés, près de la moitié consistent en des analyses d'authentiques expériences de laboratoire (même si certaines sont nécessairement simplifiées !), avec leurs techniques et leur démarche hypothético-déductive caractéristique. D'autres exercices, reflétant la diversité des outils pédagogiques à notre disposition, sont proposés à part sensiblement égale : calculs à effectuer, figures à légender, séries de propositions vraies ou fausses à identifier. Tant il est vrai que, s'il faut savoir raisonner (ce qui est donné à une majorité d'étudiants !) et exercer son esprit critique pour réussir en Biologie, il faut également disposer d'une somme toujours plus importante de connaissances sur lesquelles s'appuyer, et sans lesquelles il n'est hélas pas possible de progresser.

J.-C. Callen

*C'est la profonde ignorance qui inspire le ton dogmatique* — Jean de La Bruyère

# Table des matières

FICHE 1

# Les plans d'organisation cellulaire

## I La cellule, unité structurale et fonctionnelle du vivant

Tous les êtres vivants sont constitués d'unités invisibles à l'œil nu : les cellules. Cette notion est relativement récente par rapport à l'histoire de la Biologie, car elle repose sur la mise au point d'outils d'observation performants : les microscopes (**la théorie cellulaire** a été énoncée en 1838). Les organismes unicellulaires ne sont donc pas directement accessibles à notre conscience, bien qu'ils représentent le plus grand nombre d'espèces présentes sur la Terre et constituent la plus grande partie de la biodiversité actuelle, tandis que les êtres multicellulaires, parfois de très grande taille, font partie de notre monde visible et familier.

• **Plans d'organisation des cellules :** au plan strictement structural, l'ensemble des êtres vivants actuels se répartit en deux grands groupes seulement :

– les **Procaryotes**, ou bactéries, au sens large, dont les cellules sont de très petite taille : ordre de grandeur = 1 µm, avec quelques exceptions, ne présentant pas ou peu de **compartimentation** au sein de leur cytoplasme (absence d'organites limités par des membranes),

– les **Eucaryotes**, dont les cellules, de taille comprise entre 10 et 100 µm, en général, sont beaucoup plus volumineuses et présentent un cytoplasme hautement structuré, contenant une grande diversité d'organites tels que : le noyau, les mitochondries, le réticulum endoplasmique…

• **Unicellulaires et pluricellulaires :** les Procaryotes sont en général **unicellulaires** (bien qu'ils donnent parfois des populations visibles à l'œil nu), tandis que les Eucaryotes sont à la fois représentés par des organismes unicellulaires (les Protistes, très divers au plan phylogénétique), et des êtres **multicellulaires** (les Animaux, les Végétaux verts et les Champignons ; cf. fiche 2).

Chez ces derniers, à l'exception des Champignons, la pluricellularité s'accompagne toujours d'une **différenciation** morphologique et fonctionnelle des cellules, qui se regroupent en tissus, formant des organes, eux-mêmes organisés en appareils, dont l'ensemble constitue un organisme.

# II Outils et méthodes de la cytologie

Les biologistes disposent de deux types principaux d'outils pour l'observation des cellules : le **microscope photonique** et le **microscope électronique**. Bien que basés sur un principe identique, à savoir la déviation d'un flux de particules traversant l'objet à observer, ces instruments utilisent des particules différentes, respectivement les photons et les électrons.

• **Le microscope photonique** ou à lumière : la lumière traversant l'objet (on parle d'**observation en transmission**) est déviée par deux systèmes successifs de lentilles en verre appelés « objectifs » et « oculaires », avant de former une image agrandie sur notre rétine (ou tout système de capture d'une image). La **limite de résolution** de cet appareil (la plus petite distance entre deux points de l'objet vus de façon distincte) est au mieux de 0,25 µm, ce qui permet de distinguer à peine la plupart des bactéries ; on rappelle que cette limite, pour l'œil nu, est de 100 µm environ.

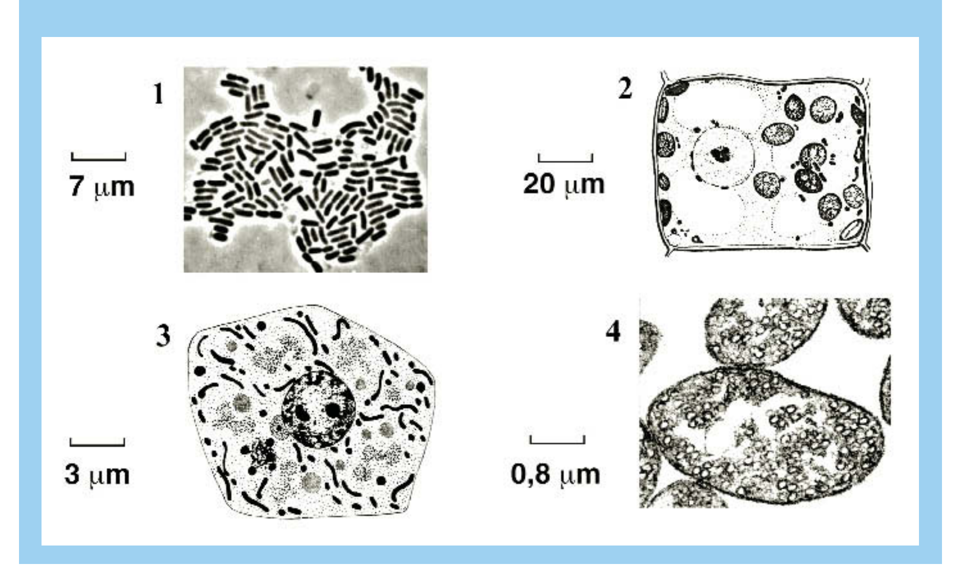
• **Le microscope électronique à transmission :** le flux d'électrons, accéléré par une très haute tension, est dévié par des lentilles électromagnétiques au sein d'une enceinte dans laquelle un vide très poussé a été réalisé. Ceci est indispensable pour que les électrons ne soient ni ralentis ni déviés par des particules gazeuses ; une première conséquence est que, à la différence du microscope photonique, **des objets vivants ne peuvent pas y être observés**. La limite de résolution de cet appareil (0,1 nm) est très inférieure à celle du microscope photonique, ce qui explique son intérêt.

• **La réalisation de coupes fines :** les objets à observer sont le plus souvent massifs, de grande taille, et non transparents à la lumière ou aux électrons, ce qui implique la réalisation de coupes fines (0,5-5 µm) ou ultrafines (50-80 nm) selon le type de microscope utilisé. Cette technique nécessite que le matériel biologique soit **fixé** (tué par un mélange de composés chimiques ne modifiant pas les structures cellulaires), puis **imprégné** d'une substance durcissant l'échantillon (étape d'inclusion en paraffine ou en résine), afin d'être **débité en tranches** les plus fines possibles (étape de micro- ou ultramicrotomie). Une dernière étape de coloration (par de vrais colorants pour la microscopie photonique, ou par des composés renforçant les contrastes en microscopie électronique) doit être réalisée avant toute observation.

• **D'autres types de microscopes et d'autres protocoles d'observation existent,** tant dans le domaine de la microscopie photonique que dans celui de la microscopie électronique ; ils seront présentés dans les chapitres suivants. Il s'agit, en particulier, du microscope photonique à fluorescence (cf. fiche 8) et du microscope électronique à balayage (cf. fiche 5) ; les protocoles de cryofracture, d'immunocytochimie et de coloration négative seront également décrits dans les fiches 6, 7 et 11.

# Cellules procaryotiques et eucaryotiques

Voici des schémas et des photos de différents types de cellules. Avec l'aide des barres d'échelle, calculez leurs dimensions exactes et identifiez celles que vous considérez comme procaryotiques ou eucaryotiques ; parmi ces dernières, savez-vous distinguer les cellules animales des cellules végétales ? Justifiez vos réponses.




## Solution

Les cellules 1 et 4 sont de **très petite taille** (respectivement 1,5 µm et 3,4 µm) et visiblement non ou peu compartimentées ; il s'agit de **Procaryotes**. Les cellules 2 et 3 sont de **taille bien supérieure** (respectivement 80 µm et 14 µm) et possèdent de nombreux **organites**, dont le noyau, volumineux et très reconnaissable ; il s'agit donc d'**Eucaryotes**. La cellule 2, qui possède de grandes vacuoles, des chloroplastes et une paroi épaisse, est une cellule végétale ; la cellule 3 est donc de type animal.

# Volumes cellulaires comparés

Une cellule bactérienne de type « coque », une cellule animale de type hépatocyte (cellule du foie) et une cellule de parenchyme végétal sont comparées du point de vue de leurs volumes. Toutes les trois sont sphériques, et leurs diamètres respectifs sont les suivants : 2 µm, 20 µm et 100 µm.

**1.** Calculer le volume de la cellule bactérienne et prévoir, sans faire les calculs directs, les rapports existant entre les volumes des deux autres types de cellules et celui de cette bactérie.
**2.** Prévoir également, sans faire les calculs directs, l'évolution du rapport Surface cellulaire/Volume cellulaire quand on passe d'un type de cellule à l'autre, et en tirer les conséquences physiologiques concernant les liens entre échanges avec le milieu et métabolisme cellulaire.
On donne : surface d'une sphère = $4\pi r^2$ ; volume d'une sphère = $4/3\pi r^3$.

## Solution

**1.** Le volume de la **bactérie** (rayon = 1 µm) est de 4,18 $\mu m^3$. Le rayon de la **cellule animale** étant 10 fois plus grand que celui de la bactérie, son volume est 1 000 fois supérieur (on élève 10 au cube) et vaut donc 4 180 $\mu m^3$. Celui de la **cellule végétale** étant 50 fois plus grand, son volume est 125 000 fois supérieur à celui de la bactérie, soit un volume de 522 500 $\mu m^3$. Ces calculs simples montrent que les cellules eucaryotiques sont beaucoup plus volumineuses que les cellules procaryotiques ; ceci explique aisément pourquoi les premières peuvent faire l'objet d'une **compartimentation** et/ou d'une **différenciation** poussées, absentes chez les dernières.
**2.** Sans avoir à faire de calculs, on constate que la surface est une fonction du carré de la dimension de la cellule, alors que son volume est une fonction du cube de cette même dimension ; **plus les cellules sont grosses et plus le rapport S/V diminue**. Ceci a des conséquences importantes pour l'activité cellulaire, car c'est à travers la surface que se font les nécessaires échanges nutritifs avec le milieu, alors que l'activité métabolique concerne l'ensemble du volume cellulaire.
Il est admis que le passage évolutif du plan d'organisation procaryotique au plan eucaryotique, avec une grande augmentation de la taille des cellules, n'a pu être réalisé qu'au prix d'une **compartimentation interne** poussée et de l'acquisition/invention d'organites diversifiés prenant en charge des activités remplies par la membrane plasmique des Procaryotes. Voir la notion de « **théorie endosymbiotique** » : cf. fiche 20.

## Combien de cellules dans une colonie bactérienne ?

Une colonie bactérienne a été obtenue sur un milieu de culture gélosé par multiplication d'une seule cellule initialement déposée à sa surface (même espèce que celle étudiée dans l'exercice précédent). Cette colonie a une forme lenticulaire et mesure 4 mm de diamètre sur 1 mm de hauteur ; on admettra que son volume est approximativement égal à la moitié du volume d'un cylindre de mêmes dimensions.

**1.** Si l'on admet aussi que la moitié du volume de cette colonie est représenté par de l'eau (ou de la solution nutritive) remplissant les espaces intercellulaires, pouvez-vous calculer le nombre de cellules contenues dans cette colonie ?
**2.** Cette colonie ayant été obtenue après un temps de culture de 36 h, quel est le temps de génération (durée de la période entre 2 divisions) chez cette bactérie ?
**3.** Quelle serait la longueur théorique d'un filament obtenu en mettant bout à bout toutes les cellules de cette colonie, et seriez-vous capable de le voir à l'œil nu ?
On donne : surface d'un cercle = $\pi r^2$ ; la valeur de $2^9$ est très voisine de 500 (512), et celle de $2^{10}$ est très voisine de 1 000 (1 024).

## Solution

**1.** Le volume total de la colonie, équivalent au demi-volume du cylindre, est donc égal à : $3{,}14 \times 4 \times 1/2 = 12{,}56/2$ mm$^3$, soit 6,28 mm$^3$. Si les cellules seules représentent la moitié de ce volume, on obtient la valeur de 3,14 mm$^3$. Sachant que 1 mm$^3$ représente $10^9$ µm$^3$ et que le volume d'une cellule bactérienne est de 4,18 µm$^3$, on calcule un effectif de **$7{,}5 \cdot 10^8$ cellules pour cette seule colonie**. Cette valeur est telle que, dans seulement 10 colonies de cette taille, il y a plus de cellules bactériennes que d'êtres humains sur notre planète !
**2.** La croissance d'une population de bactéries suit une progression exponentielle : $2^n$, n étant le nombre de générations (divisions). On peut aisément calculer ce nombre sachant que $2^{10}$ = environ 1 000 ; la valeur de $7{,}5 \cdot 10^8$ se décompose donc en $750 \times 1\,000 \times 1\,000$. Si on considère que 750 est légèrement supérieur à $2^9$, on obtient : $2^9 \times 2^{10} \times 2^{10}$, soit $2^{29}$ ; il a donc fallu **29 générations** pour passer de 1 cellule à la colonie finale, ce qui a été réalisé en 36 h. Une génération dure donc 36/29 h = 1,24 h, ce qui équivaut à 75 minutes environ. La rapidité de division des bactéries est impressionnante et, en milieu de culture liquide (plus favorable à la croissance), **les temps de génération atteignent 20 minutes**.
Ces simples remarques permettent de comprendre aisément pourquoi les micro-organismes en général, et les bactéries en particulier, ont constitué un moyen irremplaçable de recherche de mutants (par définition extrêmement rares) et donc d'études génétiques. Les développements rapides de la Génétique et de la Biologie Moléculaire, dans la deuxième moitié du XX$^e$ siècle, sont essentiellement dus à leur utilisation (***Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae, Neurospora crassa***).
**3.** La longueur du filament obtenu avec les $7{,}5 \cdot 10^8$ cellules (diamètre individuel : 2 µm), est de $1{,}5 \cdot 10^9$ µm, soit **1,5 km** ! Et pourtant, un tel filament, très long mais très fin, **ne pourrait être observé à l'œil nu**, car sa limite de résolution est de 100 µm.

FICHE 2

# La diversité du monde vivant

## I La diversité du vivant ; l'arbre du vivant

Si l'on considère le seul plan d'organisation cellulaire, qui est bien connu depuis les débuts de la microscopie électronique, l'ensemble du monde vivant se répartit en **Procaryotes** et **Eucaryotes**. Depuis la fin des années 1970, cependant, de nouvelles données biochimiques et moléculaires ont conduit à reconsidérer ce découpage et à envisager trois grands groupes d'êtres vivants équivalents au plan phylogénétique : les **Bacteria** (Bactéries, Eubactéries) et les **Archea** (Archées, Archébactéries), qui sont des Procaryotes, et enfin les **Eucarya** (Eucaryotes).

**• Les arbres phylogénétiques :** les données de plus en plus abondantes concernant les séquences d'ADN de génomes d'organismes très divers permettent de calculer des **degrés de parenté** entre eux de plus en plus fiables, et donc de tracer des arbres phylogénétiques extrêmement précis. L'arbre « du vivant » est désormais disponible.

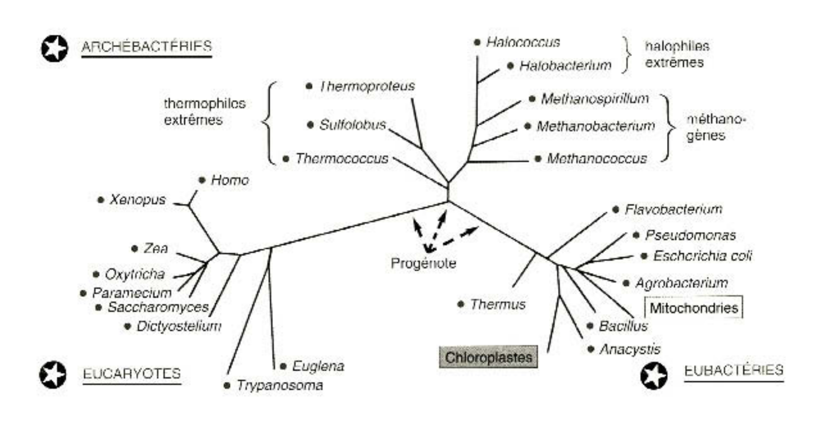
**• Les Bacteria :** ce sont les bactéries « classiques », étudiées depuis les débuts de la Microbiologie, et dont font partie des organismes-modèles tels que *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*. On distingue deux grands groupes, sur la base de l'organisation des membranes et de la paroi : les **Gram négatives** et les **Gram positives**.

**• Les Archea :** ces micro-organismes se distinguent des Procaryotes précédents par de multiples caractéristiques. Au plan physiologique, ils sont remarquables par leurs aptitudes à vivre dans des **conditions d'environnement exceptionnelles** (anoxie absolue, température, acidité ou salinité extrêmes). Sur le plan biochimique, ils possèdent des molécules et des voies de biosynthèse uniques dans le monde vivant ; du point de vue moléculaire, les mécanismes génétiques qu'ils mettent en œuvre possèdent des points communs à la fois avec les Bacteria et les Eucarya.

**• Les Eucarya :** il s'agit des groupes bien connus suivants : les **Animaux** (Métazoaires), les **Végétaux** verts (Métaphytes), les **Champignons** (Eumycètes) et les **Protistes** (êtres tous unicellulaires). Ces derniers représentent, à la différence des groupes précédents, un ensemble polyphylétique très hétérogène dont la diversité dépasse, et de très loin, celle rencontrée chez tous les multicellulaires réunis.

## L’arbre du vivant

Cet arbre du vivant extrêmement simplifié a été établi à partir de l’étude comparative des ARN ribosomiques 16 et 18 S ; toutes les données obtenues à partir d’analyses portant sur des gènes de protéines très divers confirment cette phylogénie. Les séquences concernant les mitochondries et les chloroplastes sont mentionnées pour montrer leur enracinement chez les Bactéries (Bacteria) Gram négatives.




# II L’observation des cellules vivantes au microscope photonique

Très peu de cellules peuvent en fait être observées directement, à l’état vivant, au microscope photonique. Seules celles vivant à l’état isolé, telles que des bactéries ou des Protistes, ou bien des cellules sanguines, des cellules épithéliales (épidermiques chez les végétaux), ou enfin des cellules en culture, sont suffisamment fines et transparentes pour être analysables sans préparation particulière, c’est-à-dire sans réaliser de coupes. De plus, les cellules vivantes sont en général transparentes et incolores, ce qui rend impossible l’analyse fine de leurs structures internes.

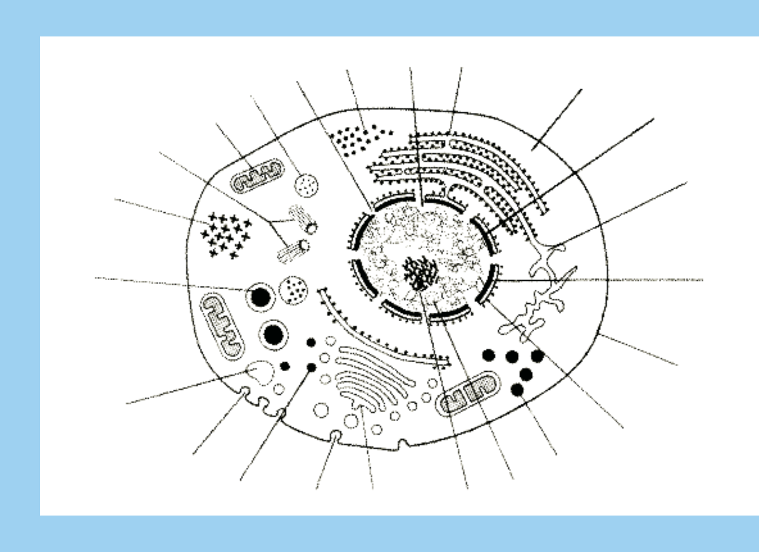
• **Les milieux de survie :** si l’observation doit se prolonger, il faut utiliser des milieux de montage et des dispositifs appropriés appelés « **chambres de survie** », dans lesquels les conditions physicochimiques sont étroitement contrôlées. Il existe en outre des microscopes spécialement conçus pour l’observation des cellules en culture, directement dans leur boîte de milieu ; les objectifs sont situés sous la platine porte-objet et la lumière arrive par le dessus, puis traverse les parois transparentes de la boîte de culture. On parle dans ce cas de « **microscope inversé** ».

• **Les techniques de coloration vitales :** de nombreuses techniques de coloration utilisant des **colorants dits « vitaux »**, non toxiques, ont été développées : le rouge neutre, par exemple, est un colorant qui s'accumule spécifiquement dans les vacuoles végétales. Ces méthodes sont actuellement délaissées au profit de l'emploi de microscopes photoniques auxquels des dispositifs physiques sont ajoutés, de sorte que des structures incolores apparaissent visibles dans des teintes de gris plus ou moins foncées. Le **microscope à contraste de phase**, par exemple, transforme des différences minimes d'indice de réfraction de la lumière traversant les organites en différences d'intensité lumineuse. Le **microscope interférentiel**, basé sur un principe différent, fait apparaître les structures cellulaires en relief.

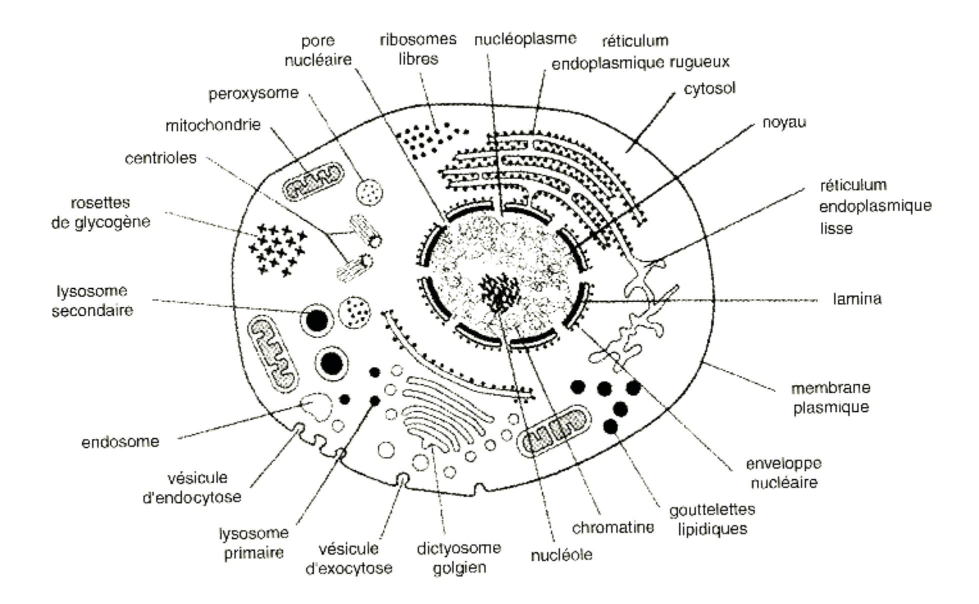
• **L'utilisation de la fluorescence :** les sondes d'activités métaboliques sont des **composés fluorescents** permettant de visualiser actuellement tous les organites cellulaires, en temps réel, dans des cellules vivantes. De même, l'injection d'**anticorps fluorescents** qui reconnaissent des macromolécules spécifiques et les rendent ainsi visibles, sans perturber la physiologie cellulaire, est une technique très importante. Enfin, l'utilisation de la **GFP** (cf. fiche 28) est devenue, depuis un peu plus de 10 ans, une approche incontournable en Biologie Cellulaire.

## Organisation des cellules animales

Compléter les légendes de ce schéma (observation en microscopie électronique) :

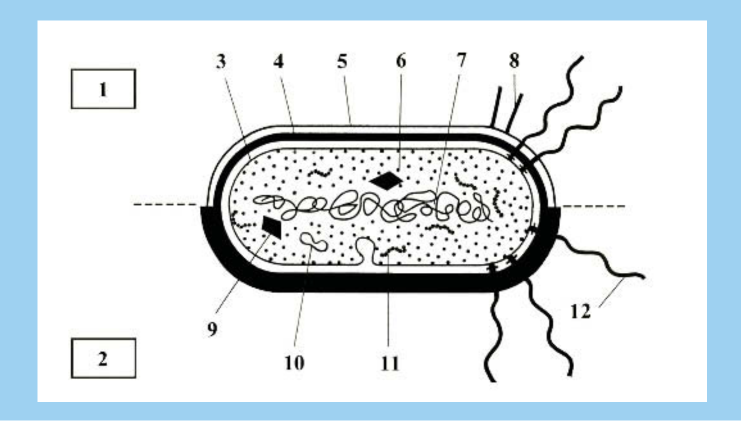


## Solution




## Organisation des cellules bactériennes

Un schéma de l'organisation générale des cellules bactériennes (Bacteria) observées en microscopie électronique vous est proposé : **1.** distinguer les deux grands types de Bactéries différant par leurs membranes (et paroi) et, **2.** compléter les légendes.



## Solution

**1. Bactérie Gram négative** (2 membranes et un peptidoglycane fin) et, **2. Gram positive** (1 seule membrane, cytoplasmique, et un peptidoglycane très épais).
**3. Membrane cytoplasmique** (bicouche lipidique avec des protéines intégrées).
**4. Paroi,** faite de peptidoglycane (molécule géante formant l'enveloppe cellulaire).
**5. Membrane externe**, spécifique des Bactéries Gram négatives.
**6. Ribosome** (particule servant à la synthèse des protéines).
**7. Nucléoïde** : molécule d'ADN circulaire constituant l'information génétique.
**8. Pilus** : filament protéique servant à la reconnaissance et à l'adhérence.
**9. Granule de réserve** : stockage de polysaccharides ou de protéines.
**10. Plasmide** : mini chromosome circulaire (information génétique accessoire).
**11. Polyribosome** : suite de ribosomes fonctionnant sur un même ARN messager.
**12. Flagelle locomoteur**, ancré dans la membrane cytoplasmique.

## Métabolismes bactériens

Une des caractéristiques majeures des bactéries en général, est l'extrême **diversité des métabolismes** qu'elles possèdent, en comparaison de ceux décrits chez les Eucaryotes. Les propositions suivantes illustrent bien la diversité de leurs types trophiques. Répondre par Vrai ou Faux.
**1.** Les Cyanobactéries effectuent une photosynthèse très particulière utilisant $H_2S$.
**2.** Certaines espèces d'Eubactéries fabriquent du méthane à partir de $CO_2$ et $H_2$.
**3.** Les bactéries anaérobies strictes meurent en présence de $O_2$.
**4.** Seul l'azote organique est utilisé par toutes les bactéries pour leur métabolisme.
**5.** Les Halobactéries sont insensibles aux concentrations très élevées en sels.
**6.** Les bactéries sont capables de métaboliser le pétrole et ses dérivés chimiques.

## Solution

**1. Faux** : tout comme les Végétaux verts, elles utilisent **l'eau** comme molécule donneuse d'$H_2$ et produisent de l'$O_2$. Seules les Bactéries photosynthétiques « vertes » et « pourpres » utilisent $H_2S$ ou des composés soufrés reduits comme donneurs d'$H_2$.
**2. Faux** : cette propriété est réservée à certaines Archébactéries : les **Méthanogènes**.
**3. Vrai** : en revanche, de nombreuses espèces **anaérobies facultatives** survivent en absence d'$O_2$ et modifient alors leur métabolisme énergétique (fermentation).
**4. Faux** : de très nombreuses espèces tirent leur azote des **sels minéraux** du milieu ($NO_3^-$, $NH_4^+$) ou même du diazote ($N_2$) atmosphérique.
**5. Vrai** : non seulement ces Archébactéries sont insensibles à des concentrations salines extrêmes, mais **elles sont en fait tuées** par des solutions salines diluées.
**6. Vrai** : elles sont susceptibles de dégrader tous les **composés organiques** connus.

FICHE 3

# Les membranes biologiques

## I Composition chimique et architecture des membranes

Toutes les membranes biologiques sont organisées de la même façon, qu'il s'agisse de la membrane cytoplasmique propre à chaque cellule ou des membranes internes caractéristiques des Eucaryotes (organites). Elles contiennent, dans des proportions variables, trois types de molécules : des lipides, des protéines et des glucides.

**• Les lipides membranaires :** ils représentent de 25 à 75 % de la masse des membranes et possèdent une caractéristique commune, l'**amphiphilie** (ou amphipathie), c'est-à-dire la présence de deux domaines ayant des propriétés physico-chimiques opposées dans la molécule : un domaine hydrophile et un domaine hydrophobe, constitué de deux acides gras. Cette propriété est capitale, car elle permet l'**autoassemblage** en une bicouche : deux feuillets lipidiques accolés par leurs domaines hydrophobes. On distingue :

- des **phospholipides**, construits à partir de 2 alcools (glycérol ou bien sphingosine), de 2 acides gras, d'une molécule d'acide phosphorique et d'une molécule polaire ;
- des **glycolipides**, contenant des motifs saccharidiques (sans ac. phosphorique) ;
- du **cholestérol**, abondant dans les membranes animales seules, et qui à la différence des autres lipides, n'est pas un ester d'acides gras.

**• Les protéines :** elles représentent aussi une proportion importante de cette masse : 20 à 75 %, selon les membranes cellulaires. Très diversifiées, ce sont elles qui contribuent réellement à leur spécificité et qui assurent leurs fonctions particulières. Les **glucides** membranaires n'existent jamais à l'état libre, mais sont toujours associés aux lipides (glycolipides) ou aux protéines (glycoprotéines).

**• Architecture :** elles sont toutes organisées selon le modèle d'une **bicouche lipidique fluide** dans laquelle sont enchâssées plus ou moins profondément les protéines membranaires. On en distingue deux types, celles dites **intrinsèques** (intégrales), et celles dites **extrinsèques** (périphériques). Les premières sont solidement associées à la bicou-

che, qu'elles peuvent traverser de part en part (elles possèdent alors un ou plusieurs domaines hydrophobes), ou dans laquelle elles sont ancrées par des chaînes de lipides ou d'acides gras. Les secondes sont hydrophiles et liées aux premières par des liaisons faibles de surface. Tout comme les lipides, les protéines peuvent se déplacer par **diffusion latérale**, au sein des membranes, mais sont incapables de basculer d'un feuillet dans l'autre.

## II Les techniques d'étude de la structure des membranes

Un nombre considérable d'expériences concernant l'architecture membranaire a été conduit sur les **hématies de Mammifères**. Ces cellules très différenciées constituent un excellent modèle biologique pour ce genre d'études, car elles ne contiennent plus aucun organite et leur seule membrane est la membrane plasmique, qui peut donc être aisément purifiée après hémolyse puis centrifugation (on parle de « fantômes » d'hématies) ; elles peuvent en outre être obtenues en très grandes quantités.

• **Techniques d'homogénéisation et de fractionnement cellulaire :** différents protocoles (cf. fiche 15) ont été mis au point afin d'obtenir, à partir de ces hématies, des vésicules membranaires dont la polarité est celle de la membrane plasmique de départ (vésicules dites « normales »), ou des vésicules dites « retournées », dont la polarité est inverse, c'est-à-dire que leur face externe correspond à la face interne de la membrane plasmique initiale.

• **Étude de l'architecture des membranes :** elle commence par la dissolution de la bicouche au moyen de **détergents**, puis l'identification de toutes les protéines membranaires est réalisée après une **électrophorèse dénaturante** (cf. fiche 9). De même, l'analyse des différents lipides est faite grâce à la **chromatographie** (cf. fiche 22). Cette approche globale est complétée par une analyse de l'architecture précise, c'est-à-dire la position exacte des lipides dans chaque feuillet membranaire et la manière dont les protéines sont disposées dans la bicouche (étude de **l'asymétrie membranaire**). Les protéines extrinsèques sont décrochées de la membrane par des traitements « doux » tels que des changements de pH ou de force ionique du milieu.

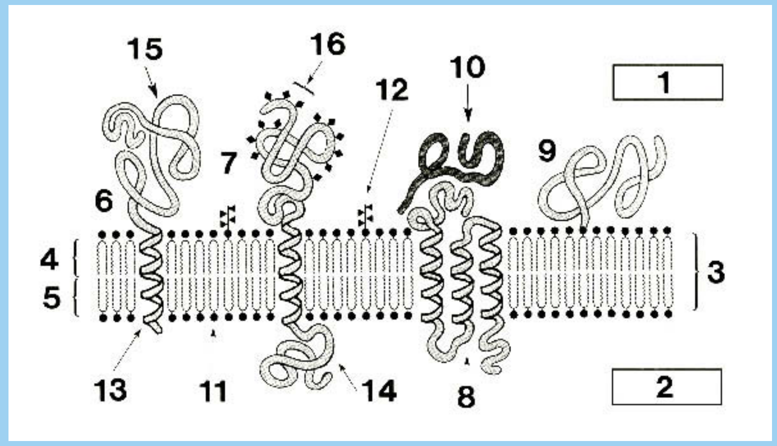
• **Techniques de marquage radioactif ou chimique :** il est possible de marquer enzymatiquement certains groupements fonctionnels des protéines ou des lipides grâce à des **radio-isotopes** (ou des **composés fluorescents ;** cf. fiche 8). Ceci se réalise soit sur des cellules entières et intactes, soit sur des cellules perméabilisées, soit enfin sur des vésicules artificielles « normales » ou « retournées ». Le marquage se faisant *in vitro* et l'accessibilité de ces groupements n'étant pas la même vis-à-vis du marquage, selon les

différentes situations, l'analyse des molécules marquées (après électrophorèse ou chromatographie) donnera des informations précieuses sur leur orientation dans la bicouche.

• **Utilisation d'enzymes :** l'analyse des protéines membranaires peut impliquer leur digestion par des **peptidases** spécifiques, suivie par l'électrophorèse des peptides obtenus. Les chaînes glucidiques portées par les protéines ou les lipides peuvent être décrochées par des **glycosidases** ; ces chaînes, tournées uniquement vers l'extérieur des cellules, ne sont en effet accessibles que sur des cellules entières ou des vésicules « normales » obtenues *in vitro*. De la même façon, les lipides sont digérés par des **phospholipases**, ce qui permet d'étudier leur asymétrie de répartition.

## Organisation générale d'une membrane plasmique

Schéma à légender, en précisant la polarité de la membrane.




## Solution

**1.** extérieur de la cellule
**2.** intérieur de la cellule
**3.** bicouche lipidique
**4.** feuillet lipidique externe
**5.** feuillet lipidique interne
**6.** protéine intrinsèque (à un passage)
**7.** glycoprotéine intrinsèque
**8.** protéine intrinsèque (à trois passages)
**9.** protéine intrinsèque à ancre lipidique
**10.** protéine extrinsèque externe
**11.** phospholipide
**12.** glycolipide
**13.** hélice alpha hydrophobe
**14.** domaine globulaire intracellulaire
**15.** domaine globulaire extracellulaire
**16.** motifs glycosidiques

# Constitution de la membrane de l'hématie

Les principaux constituants des **membranes d'hématies humaines** sont les phospholipides, le cholestérol et les protéines, dans les proportions respectives suivantes (en masse) : 30 %, 10 % et 50 %. Leurs masses moléculaires moyennes sont les suivantes, respectivement : 750 Da, 386 Da et 120 kDa.
On admet que : **a.** le diamètre d'un phospholipide (en place dans la bicouche) et celui du cholestérol sont voisins de 0,8 nm et, **b.** le diamètre d'une protéine transmembranaire est voisin de 3 nm. Surface d'un cercle = $\pi r^2$.
On se propose de calculer :
**1.** le nombre relatif de molécules de lipides et de protéines intrinsèques (leur rapport molaire) dans cette membrane,
**2.** leur nombre absolu dans un $\mu m^2$ de surface de membrane.

## Solution

**1.** Le calcul du **nombre relatif** de ces différentes molécules (rapport molaire) est basé sur la relation suivante : masse relative des molécules (en %) = nombre relatif de molécules × masse moléculaire. Les calculs sont les suivants :

- **Phospholipides** : 30 = a × 750, d'où a = 0,04
- **Cholestérol** : 10 = b × 386, d'où b = 0,026
- **Protéines** : 50 = c × 120 000, d'où c = 0,00041

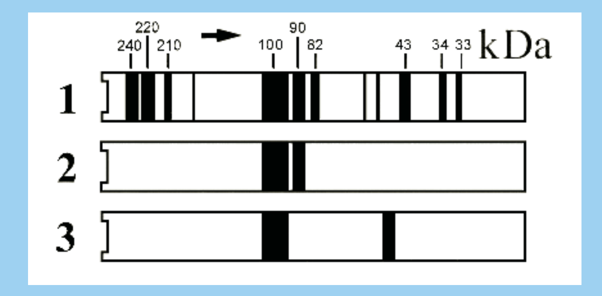
- Si on prend comme référence une seule molécule de protéine, on convertit c en c' = **1**, ce qui donne, par simple proportionnalité : a' = **97** molécules de phospholipides et b' = **63** molécules de cholestérol (**160 lipides** en tout).
- Si on traduit ensuite ces données en termes de **bicouche lipidique**, on a donc une surface membranaire représentée par **80 lipides** : 48 phospholipides et 31 molécules de cholestérol environ dans chaque feuillet, si la répartition y est identique.

**2.** La surface occupée par un lipide dans une bicouche est de : 3,14 × 0,4 × 0,4 = 0,5 $nm^2$, soit 80 × 0,5 = **40 $nm^2$ pour 80 lipides.**

- La surface occupée par une protéine est de : 3,14 × 1,5 × 1,5 = **7 $nm^2$**.
- La surface membranaire est donc constituée en moyenne de « modules » comprenant une protéine pour 80 lipides, dont la surface est de 7 + 40 = **47 $nm^2$**.
- Dans 1 $\mu m^2$ de surface membranaire, on compte donc $10^6/47 = 2{,}1 \cdot 10^4$ modules de ce type, soit **$2{,}1 \cdot 10^4$ protéines pour $1{,}68 \cdot 10^6$ lipides**.

# Architecture de la membrane d'hématie

L'étude des protéines des **membranes d'hématies humaines** est conduite sur des « fantômes » obtenus après hémolyse et centrifugation. Une électrophorèse des protéines extraites des culots membranaires (en présence de SDS, cf. fiche 9) donne le profil présenté dans le gel 1, après coloration au bleu de Coomassie.
À partir des fantômes, on a ensuite réalisé des **vésicules retournées**, qui montrent sur leur face externe les protéines ou les domaines protéiques normalement tournés vers l'intérieur de la cellule. Un **traitement avec une solution saline** à force ionique élevée permet de décrocher toutes les protéines faiblement liées situées sur la face externe de ces vésicules. Le résultat de l'électrophorèse des protéines restant associées aux membranes est donné dans le gel 2. Une expérience identique réalisée avec des **vésicules normales** donne le même profil que le gel 1.
Enfin, un traitement par une **glycosidase** est effectué sur ces protéines fortement associées aux membranes, avant l'électrophorèse ; pour le résultat, voir le gel 3.
Quelles conclusions tirez-vous de l'analyse des trois gels ?




Les masses moléculaires des protéines sont exprimées en kDaltons.

## Solution

**1.** Le gel 1 montre **l'ensemble des protéines** contenues dans la membrane de l'hématie. On en compte 12, dont les masses moléculaires vont de 240 à 33 kDa.
**2.** Sur le gel 2, on n'observe plus que deux bandes (100 et 90 kDa) ; il s'agit donc de **protéines intrinsèques**, car toutes les protéines extrinsèques internes de la membrane native ont été éliminées par le traitement salin. L'expérience faite avec des vésicules normales montre qu'il n'existe pas de protéines extrinsèques externes, car aucune protéine n'a été éliminée (décrochée).
**3.** Le gel 3 montre que la plus petite des protéines intrinsèques, après action de la glycosidase, voit sa masse moléculaire très diminuée : **elle est donc glycosylée**.

FICHE 4

# Les transports membranaires

## I Perméabilité des membranes et transporteurs membranaires

La membrane cytoplasmique, interface entre la cellule et son environnement, est le lieu de passage de très nombreux composés minéraux et organiques qui alimentent le métabolisme cellulaire ou qui sont évacués en tant que déchets. Seules les molécules hydrophobes, les gaz dissous, l'eau et les molécules hydrophiles (polaires) non chargées, de faible masse moléculaire, franchissent les bicouches phospholipidiques avec une certaine facilité, sous l'action de la seule diffusion.

• **Les transporteurs membranaires :** tous les composés polaires de masse élevée, les molécules organiques chargées et les ions minéraux sont totalement arrêtés par ces mêmes bicouches ; or, tous sont d'une importance capitale pour le fonctionnement des cellules (métabolisme, potentiel de membrane…). Pour pénétrer dans les cellules, ces derniers doivent donc emprunter des dispositifs appropriés, constitués par des **canaux**, des **pores** ou des **protéines porteuses** : il s'agit de protéines transmembranaires de grande taille, souvent constituées de plusieurs sous-unités, qui fonctionnent de deux façons très différentes.

• **Les transports passifs facilités :** ces transporteurs accélèrent les transports par diffusion en constituant de simples orifices sélectifs à travers la bicouche (**canaux ioniques** et **pores**, tels que les **aquaporines**), ou en fonctionnant à la manière des enzymes, c'est-à-dire en reconnaissant la molécule à internaliser au niveau d'un site spécifique, et en subissant un changement de conformation qui amène la molécule de l'autre côté de la membrane (**protéines porteuses** ou **perméases**).

• **Les transports actifs :** ils permettent de faire passer des molécules ou des ions dans le sens contraire de leur gradient électrochimique (contre les forces de diffusion), en utilisant donc une source d'énergie. On en distingue deux types :
1) les **transports actifs primaires**, qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie (pompe Na/K ATP dépendante), et 2) les **transports actifs secondaires**, qui impliquent un transport couplé (cotransport) entre un ion dit « moteur », qui suit son

gradient électrochimique (par diffusion) et entraîne en même temps (par symport ou antiport) le mouvement d'une molécule organique ou d'un autre ion dans le sens inverse de leur propre gradient (transport actif). Le maintien du gradient de l'ion moteur nécessite évidemment l'intervention d'une pompe ATP dépendante.
Il existe enfin une catégorie universelle et très originale de transporteurs actifs consommant de l'ATP, les **transporteurs dits « ABC »**, qui ne peuvent être étudiés en détail ici. Très représentés dans toutes les cellules, ils sont capables de transporter toutes sortes de composés, depuis les ions minéraux jusqu'aux protéines !

# II L'utilisation de la fluorescence pour l'étude des membranes

La fluorescence est la propriété d'une substance capable d'absorber certaines longueurs d'onde de la lumière et de réémettre une lumière de longueur d'onde différente, mais toujours de moindre énergie. De très nombreuses petites molécules artificielles, nommées **fluorochromes**, ont cette propriété ; ces composés peuvent être fixés de façon covalente à des protéines telles que les anticorps, ce qui permet de les rendre visibles par immunofluorescence (cf. fiche 8).

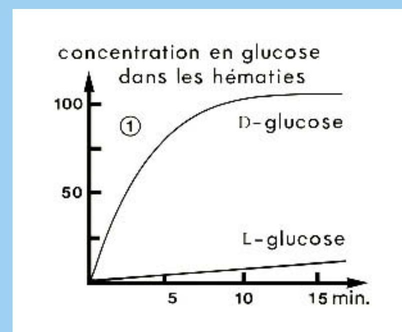
**• La technique de FRAP** (*fluorescence recovery after photobleaching*) : elle permet d'étudier les propriétés de **fluidité des membranes**. Une protéine spécifique de la membrane plasmique d'une cellule vivante en culture (cf. fiche 14) est d'abord reconnue par des anticorps couplés à un fluorochrome. Sous le microscope, cette cellule est ensuite éclairée très localement par un fin faisceau laser qui détruit le fluorochrome. La fluorescence de la zone ayant ainsi subi cette extinction (*photo-bleaching*, ou blanchiment) est ensuite mesurée au cours du temps ; on observe habituellement que celle-ci réapparaît petit à petit et retrouve une valeur identique à celle de la membrane environnante (mais inférieure à celle mesurée initialement).
Ce phénomène s'explique par la **diffusion latérale des protéines**, celles portant des anticorps « intacts » pénétrant dans la zone irradiée, et celles portant des anticorps « éteints » diffusant dans le reste de la membrane plasmique. Selon la vitesse à laquelle l'homogénéisation (*fluorescence recovery*) est atteinte, on définit un coefficient de diffusion latérale qui est caractéristique d'une protéine donnée.

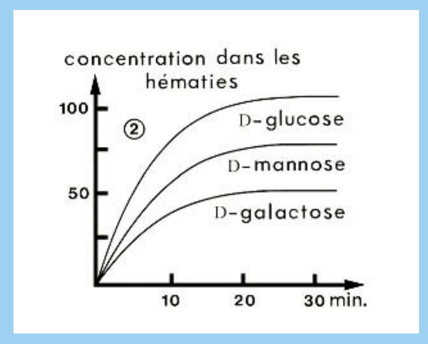
**• La technique de FLIP** (*fluorescence loss in photobleaching*) : elle est basée sur un principe voisin : une zone de la cellule dont les protéines membranaires sont rendues fluorescentes est irradiée en permanence, et on mesure la diminution de fluorescence (*loss*) dans une zone non irradiée. La vitesse à laquelle la fluorescence diminue permet de savoir à quelle vitesse les protéines diffusent en dehors du territoire irradié et sont remplacées par des molécules intactes irradiées à leur tour.

• **La technique de FRET** (*fluorescence resonance energy transfer*) : son principe est le suivant : la lumière émise par un fluorochrome peut en faire fluorescer un second si la longueur d'onde est appropriée et si les deux molécules sont en étroit contact. Si on excite le premier fluorochrome avec une lumière excitatrice donnée, on peut ainsi observer la lumière réémise par le second. Grâce à ce principe, on peut étudier les **interactions entre protéines**, qu'elles soient en solution ou qu'elles soient membranaires (cas des récepteurs, par exemple ; cf. fiches 5 et 28).

## Perméabilité des hématies de Mammifère

La perméabilité de la membrane des hématies vis-à-vis du glucose a été étudiée au moyen des isomères radiomarqués de cette molécule : le L-glucose et le D-glucose. Après des temps d'incubation variés (à 37 °C) dans une solution de glucose 10 mM de chaque type, les cellules sont centrifugées à 4 °C et la radioactivité associée au culot est mesurée. Les courbes obtenues sont présentées dans le graphe suivant (①) :




**1.** Quelle hypothèse doit-on exclure concernant le transport du glucose à travers la membrane de l'hématie ? Justifier la réponse.

La mesure de la concentration intracellulaire maximale en D-glucose (atteinte en 15 minutes, courbe ①), montre qu'elle est égale à la concentration extracellulaire :

**2.** Quel mécanisme physique est mis en jeu dans le transport du D-glucose, et comment appelle-t-on ce type de transport ?

Les transports du D-galactose et du D-mannose (isomères du glucose) radioactifs ont été étudiés dans les mêmes conditions expérimentales, et les résultats sont donnés dans le graphe ②.

**3.** Que pensez-vous de l'efficacité du transport de ces molécules, en comparaison de celle du D-glucose ?

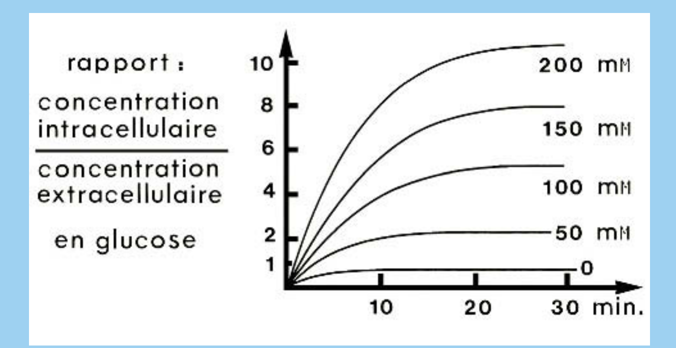
Lorsqu'on ajoute à la solution de D-glucose radioactif (10 mM) extracellulaire du D-galactose ou du D-mannose à une concentration de 200 mM, on observe que la pénétration du glucose dans les hématies est significativement ralentie.
**4.** En rassemblant les données obtenues avec ces expériences, quelles conclusions peut-on tirer concernant les mécanismes du transport du glucose dans ces cellules ?

## Solution

**1.** Le D-glucose et le L-glucose sont des isomères (même masse moléculaire) ; on peut donc exclure un phénomène de diffusion simple, car le seul paramètre en jeu (outre les propriétés physico-chimiques, ici identiques) serait ici la taille.
**2.** L'égalité des concentrations de part et d'autre de la membrane permet de confirmer qu'un phénomène (passif) de diffusion régit le transport du D-glucose.
**3.** Le transport du D-galactose et du D-mannose (même masse moléculaire) est possible, mais avec une efficacité beaucoup plus faible que pour le glucose. Seuls les isomères D des oses sont utilisables par les cellules et sont capables d'y rentrer.
**4.** Si le mannose ou le galactose ralentissent la pénétration du glucose, c'est parce qu'ils entrent en compétition avec lui au niveau d'un transporteur spécifique (capable de discriminer des isomères). Le modèle que l'on peut établir est le suivant : il s'agit d'un transport diffusif, susceptible d'être inhibé par des « analogues » chimiques du D-glucose, et qui est lié à la présence d'une protéine porteuse catalysant une **diffusion facilitée**. Il s'agit du transporteur nommé GLUT 1.

## Pénétration du glucose dans les entérocytes

La perméabilité de la membrane apicale des entérocytes vis-à-vis du glucose est étudiée sur des fragments d'intestin grêle de Mammifère. L'épithélium intestinal est unistratifié et constitué en majorité de cellules absorbantes : les entérocytes.
Des fragments d'intestin grêle sont prélevés et maintenus en culture ; une solution de glucose radiomarqué est introduite dans la lumière, puis la radioactivité intra-cellulaire est évaluée après des temps de mise en contact croissants.
L'influence de la concentration extracellulaire en $Na^+$ (du côté apical des cellules) sur le transport du glucose a été étudiée ; les courbes suivantes traduisent les effets de concentrations croissantes en $Na^+$ sur le rapport : concentration intracellulaire en glucose/concentration extracellulaire (identique dans les diverses expériences) :




**1.** Quel est l'effet de la concentration en $Na^+$ (mM) sur le transport du glucose ?
**2.** D'après l'analyse des valeurs obtenues pour le rapport des concentrations en glucose, que pensez-vous du mécanisme de transport de cette molécule ?
Quel type de transporteur doit-on invoquer, dans une telle situation ?
Lorsque les fragments d'intestin sont mis en présence (du côté externe) de ouabaïne, un composé connu pour inhiber la pompe membranaire Na/K ATPase, on observe que la pénétration du glucose dans les entérocytes est très rapidement inhibée.
**3.** Quel lien établissez-vous entre cette dernière observation et le mécanisme de transport qui a été mis en évidence plus haut ?

## Solution

**1.** La concentration extracellulaire en $Na^+$ **influe beaucoup** sur la pénétration du glucose ; plus celle-ci est élevée du côté apical des cellules et plus il entre aisément (rappel : la concentration normale du milieu intérieur en $Na^+$ = 145 mM).
**2.** Les concentrations intracellulaires en glucose peuvent être dix fois plus élevées que celle mesurée à l'extérieur ; il s'agit donc d'un transport qui s'effectue contre un gradient de concentration de cette molécule (dans le sens inverse de celui dicté par la diffusion), et donc d'un **transport actif**. On doit donc évoquer le rôle d'une molécule porteuse de glucose fonctionnant en consommant une source d'énergie.
**3.** L'arrêt de l'activité de cette pompe, qui chasse en permanence les ions $Na^+$ vers le milieu extérieur, conduit rapidement à l'augmentation de sa concentration intracellulaire ; la différence de concentration entre milieu extracellulaire et cytoplasme disparaît. Ce fait doit être corrélé avec l'arrêt de l'entrée du glucose, qui est sous le contrôle de la concentration extracellulaire en $Na^+$. C'est en fait le **gradient transmembranaire** en cet ion, du côté apical de l'entérocyte, qui permet à un **transporteur actif de type secondaire** activé par le $Na^+$, par un cotransport de type symport, l'entrée du glucose situé dans la lumière de l'intestin grêle (SGLT 1).

FICHE 5

# L'endocytose, l'exocytose et le bourgeonnement

## I Des déformations membranaires

Les cellules eucaryotiques sont capables d'échanger des macromolécules ou des particules de grande taille avec leur milieu, par le biais de structures vésiculaires impliquant des déformations de la membrane plasmique, parfois de grande ampleur.

• **L'endocytose** permet l'entrée de matériel exogène grâce à des vésicules issues d'une invagination de la membrane plasmique. Selon leur taille, on distingue la **pinocytose** (vésicules de 100 à 200 nm), et la **phagocytose** (vésicules dont la taille atteint plusieurs µm). Le premier processus présente diverses variantes ; en effet, il peut impliquer ou non des protéines de structuration spécialisées, telles que la clathrine, et il met en jeu ou non des **récepteurs membranaires**. Ces derniers possèdent un gros domaine extracellulaire permettant de fixer un **ligand** spécifique ; lors de l'endocytose, ils sont entraînés dans les vésicules, mais ils font généralement l'objet d'un recyclage, en étant renvoyés vers la membrane plasmique par **exocytose**.
Les ligands absorbés sont dirigés vers une voie de digestion intracellulaire mettant en jeu les **lysosomes** (cf. fiche 19), et les métabolites obtenus passent ensuite dans le cytosol. La **phagocytose** est le seul moyen pour de nombreux Protistes de se procurer leur nourriture ; chez les êtres multicellulaires, des cellules phagocytaires spécialisées interviennent dans les processus de défense : les **macrophages**, par exemple, en éliminent les virus, les bactéries ou les cellules vieillissantes.

• **L'exocytose** permet, grâce à des vésicules d'origine interne fusionnant avec la membrane plasmique, l'apport de matériel à cette dernière et la **sécrétion** de divers composés dans le milieu extérieur : protéines, polysaccharides et glycoprotéines issus du Réticulum endoplasmique et/ou de l'appareil de Golgi (cf. fiche 17).

• **Le bourgeonnement** est un phénomène plus rare ne concernant que certaines cellules infectées par des **virus** qui, après avoir été reproduits par cette dernière, la quittent en emportant un morceau de membrane plasmique (qui devient alors leur propre

enveloppe) ; cf. fiche 30. Les bourgeons ou les vésicules ainsi formés à la surface cellulaire sont aisément observables en microscopie électronique à balayage.

## II Le microscope électronique à balayage

Comme tout microscope électronique (cf. fiche 1), cet appareil utilise un faisceau d'électrons fortement accéléré sous vide pour produire une image très agrandie de l'objet. À la différence du microscope électronique à transmission (MET), où le faisceau d'électrons traverse l'objet (nécessairement très fin), celui-ci est ici réfléchi par la surface de l'échantillon.
Par analogie avec les instruments d'optique photonique, ce microscope est donc équivalent à une loupe classique, qui permet d'observer simplement la lumière réfléchie par les objets, mais n'autorise pas l'analyse de leur organisation interne.

**• Principe du fonctionnement de l'appareil** :

- un très **fin faisceau d'électrons** (de l'ordre du nm de diamètre) est accéléré sous quelques milliers de volts (rappel : $10^5$ volts pour le MET) et focalisé sur le plan de l'objet au moyen d'une seule lentille électromagnétique. Ce faisceau balaye très rapidement la surface à observer ;
- l'objet à observer est ainsi « bombardé » par des électrons qui rebondissent en général sur sa surface, sans pénétrer à l'intérieur. En fonction de la géométrie de cette surface, la **réflexion des électrons** se fait donc dans différentes directions de l'espace ; d'autres électrons peuvent aussi être arrachés à cette surface ;
- un **détecteur d'électrons** est disposé dans la colonne du microscope, à proximité de l'objet, et il est chargé de récupérer ceux qui sont réfléchis ou réémis dans sa direction. On comprend bien que le nombre d'électrons diffusés ou émis par chaque point de l'objet, puis détectés par l'appareil, est variable selon l'angle sous lequel le faisceau rencontre la surface de l'objet ;
- le signal fourni par le détecteur est traité puis envoyé vers un écran de télévision, et le **balayage régulier du faisceau** sur l'objet est couplé au balayage du spot lumineux formant l'image sur l'écran. L'image obtenue est ainsi formée de zones claires ou sombres donnant une impression de relief très spectaculaire.

**• Résolution du microscope à balayage :** elle est inférieure à celle du MET et atteint au mieux 2 nm ; en revanche la profondeur de champ est très importante aux faibles grossissements, et il est possible d'observer des objets de taille relativement grande (de l'ordre du mm). Le matériel est en général fixé et recouvert d'une très fine couche de métal (**par ombrage métallique**, cf. fiche 3), afin de favoriser la réflexion des électrons, mais il peut aussi être congelé et observé directement.

# Mécanismes de l'endocytose du fer

Le Fer, comme de nombreux autres composés, circule dans le sang sous une forme liée à une protéine nommée **apotransferrine** ; le complexe formé avec le Fer (une molécule de protéine liée à deux ions $Fe3^{+}$) porte le nom de **ferrotransferrine**. Les cellules de notre organisme possèdent à leur surface des récepteurs qui lient spécifiquement la ferrotransferrine, mais sont incapables de lier l'apotransferrine seule. Ces récepteurs chargés permettent, par endocytose, la capture du fer par les cellules ; ce dernier est indispensable à de nombreuses enzymes.

Les chercheurs disposent d'apotransferrine purifiée et marquée radioactivement au $^{35}S$, d'une part, et de fer radioactif ($^{59}Fe$), d'autre part. On peut ainsi obtenir de la ferrotransferrine marquée soit sur le Fer, soit sur sa partie protéique. Les expériences suivantes ont pour but d'étudier les mécanismes de l'endocytose du Fer.

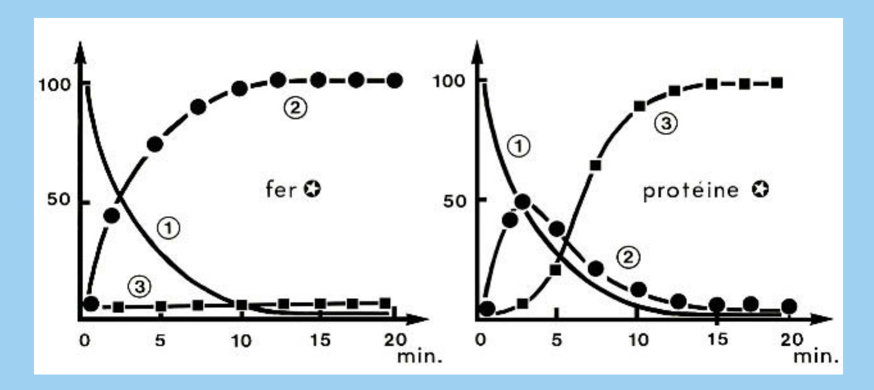
1) Deux lots de **cellules humaines** en culture sont mis en présence, pendant 30 minutes et à 4 °C, de ferrotransferrine marquée soit grâce au Fer, soit dans sa partie protéique. Après cette incubation, les cellules sont remises en culture dans un milieu neuf, dépourvu de fer et de ferrotransferrine, et à 37 °C.

2) Des prélèvements de cellules sont ensuite effectués dans les deux lots, au cours du temps (20 min), et deux types de mesures sont réalisés sur ces cellules :

– la radioactivité présente **à leur surface** (courbe 1), mesurée en décrochant le ligand de son récepteur grâce à une solution de force ionique élevée ;

– la radioactivité présente **dans les cellules** après ce traitement (courbe 2).

Simultanément, la radioactivité du **milieu de culture** est mesurée pendant toute la durée de l'expérience (courbe 3). Les graphes suivants montrent l'évolution de ces trois types de mesures, exprimées en %, au cours du temps.



**1.** Pour quelles raisons les cellules sont-elles d'abord **mises à 4 °C**, en présence de ferrotransferrine radioactive ?
**2.** Comment la radioactivité **en surface des cellules** évolue-t-elle au cours de ces deux expériences ? Comment interprétez-vous ces résultats ?
**3.** Comment la radioactivité associée au Fer et celle associée à la protéine évoluent-elles **pendant les 5 premières minutes**, dans les deux expériences ? Comment interprétez-vous ces résultats ?
**4.** Comment la radioactivité associée au Fer et celle associée à la protéine évoluent-elles au cours de la **suite de l'expérience** ? Comment interprétez-vous ces résultats ?
**5.** Pourquoi la radioactivité mesurée dans le milieu de culture évolue-t-elle différemment dans les deux expériences ? Quelle relation faites-vous avec les résultats analysés dans la question 3, après 5 min d'incubation des cellules ?
**6.** À partir de l'ensemble de ces données, schématiser **l'histoire des récepteurs** ainsi que celle de la **ferrotransferrine** au cours du processus d'endocytose du Fer.

## Solution

**1.** À 4 °C, les membranes biologiques sont **figées** et tous les phénomènes liés à la fluidité membranaire : la diffusion latérale des protéines (ici, les récepteurs) et l'endocytose, sont supprimés. La fixation de la ferrotransferrine (ici, le ligand) sur son récepteur n'est pas, en revanche, affectée. Après 30 min d'incubation, **tous les récepteurs ont lié leur protéine**, et le passage à 37 °C provoquera l'endocytose simultanée et immédiate de tous ces récepteurs chargés : **synchronisation du phénomène à to**, début des mesures de radioactivité.

**2.** Au cours du temps, la radioactivité en surface diminue rapidement dans les deux expériences, ce qui montre **l'internalisation par endocytose** de tous les récepteurs chargés ; elle est presque complète au bout de 20 minutes.

**3.** Lorsqu'on mesure la radioactivité liée au **Fer** pendant les 5 premières minutes, on observe son **accumulation régulière** dans le cytoplasme selon une courbe « symétrique » de celle vue pour la radioactivité mesurée en surface ; il faut noter que 50 % de la ferrotransferrine fixée en surface par les récepteurs est déjà entrée dans les cellules au bout de 5 minutes !

Lorsqu'on mesure la radioactivité liée à la **partie protéique** (apotransferrine) pendant les premières minutes, la courbe montre une accumulation rapide dans la cellule, mais qui semble nettement s'atténuer lorsqu'on atteint les 5 minutes. Ceci montre également que **les récepteurs entrent dans les cellules** par endocytose.

**4.** La radioactivité liée au fer continue d'augmenter dans les cellules, et tout le Fer fixé par la ferrotransferrine **est finalement absorbé** au bout de 25 minutes.

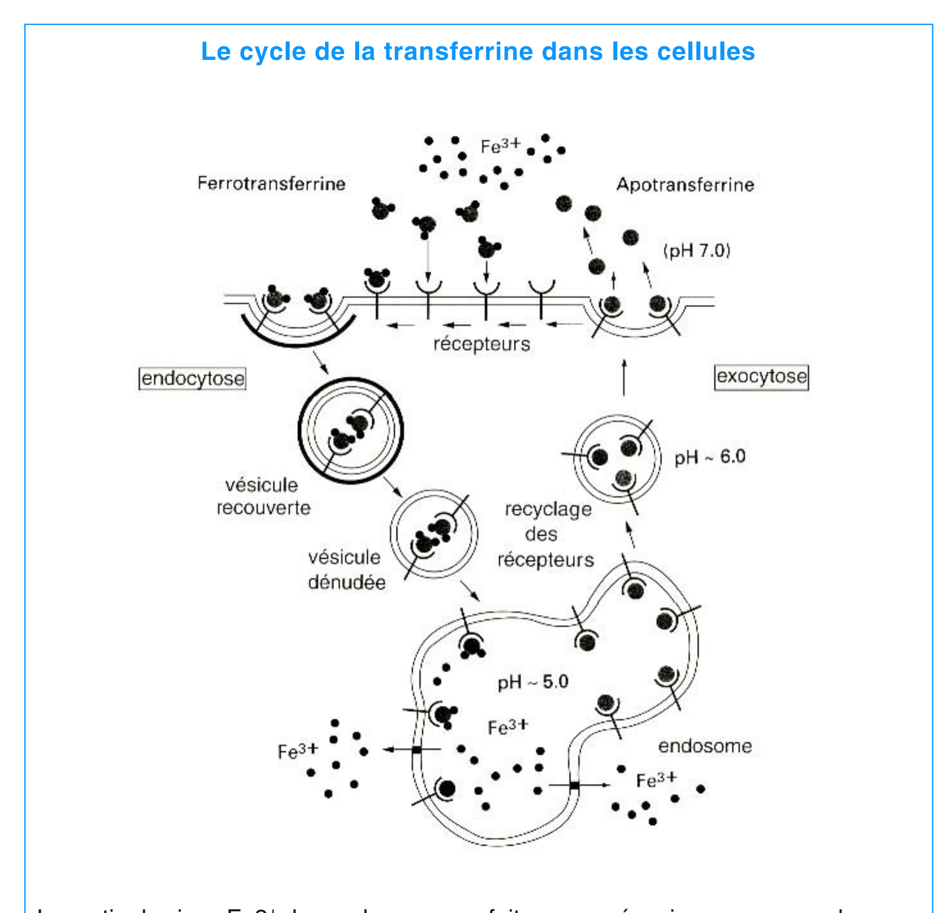
En revanche, la radioactivité liée à l'apotransferrine a un comportement très différent de celle du Fer puisqu'elle diminue à partir de 5 minutes, pour atteindre une valeur quasi

nulle au bout de 30 minutes. Ceci montre clairement que **le devenir du Fer et celui de la protéine qui le fixe sont très différents** ; ces deux composantes de la ferrotransferrine doivent donc se dissocier à un moment de cette histoire.

**5.** On ne retrouve jamais de radioactivité liée au Fer dans le milieu de culture, au cours de l'expérience, ce qui montre que **tout le fer fixé est entré** dans les cellules de façon irréversible. En revanche, on retrouve de la radioactivité liée à l'apotransferrine dans le milieu, ce qui montre que cette protéine **a été exocytée** et donc libérée de son récepteur, après que ce dernier soit retourné en surface de la cellule.

**6.** Le récapitulatif de tous ces événements est donné sous la forme d'un **schéma** général montrant les rôles respectifs de l'endocytose et de l'exocytose des protéines impliquées dans ces processus, ainsi que les compartiments mis en jeu.

## Le cycle de la transferrine dans les cellules




La sortie des ions $Fe3^{+}$ des endosomes se fait par un mécanisme encore mal connu.

FICHE 6

# Les jonctions membranaires des cellules animales

## I Organisation et rôles des jonctions intercellulaires

Les cellules animales différenciées s'organisent en ensembles homogènes appelés « tissus » grâce à divers dispositifs membranaires qui accrochent solidement les cellules entre elles, ou assurent une communication directe entre cytoplasmes. Les épithéliums, tissus qui bordent les cavités internes des organismes ou recouvrent leur surface, sont les plus riches en jonctions, qui leur confèrent leur résistance mécanique. Sur la base de leurs fonctions, on décrit trois types de jonctions.

• **Les jonctions étanches** (ou « serrées ») : elles sont situées dans la partie apicale des cellules et forment une ceinture de points de soudure entre les membranes adjacentes, qui sont donc très rapprochées. Ces points de contact s'établissent directement entre des **protéines transmembranaires** identiques de chaque cellule. Les points de soudure jointifs s'organisent en nombreuses lignes ramifiées plus ou moins parallèles, de sorte que cette ceinture est parfaitement étanche et ne laisse passer aucun composant de part et d'autre de la couche de cellules voisines.

• **Les jonctions d'ancrage :** il en existe deux types, celles qui accrochent les cellules entre elles et celles qui accrochent les cellules à leur lame basale (cf. fiche 27) ; toutes deux ont des relations directes avec le cytosquelette (cf. fiche 7).

– les *ceintures d'adhérence* sont situées dans la partie apicale des cellules épithéliales ; elles sont formées de faisceaux de **microfilaments d'actine** parallèles à la membrane plasmique. Les ceintures de deux cellules voisines sont en contact étroit grâce à des protéines transmembranaires de type cadhérines.
– les *desmosomes ponctuels* sont situés sur les faces latérales des cellules. Ils sont formés de deux disques intracellulaires disposés l'un en face de l'autre, reliés par des protéines transmembranaires de type cadhérines ; ils entrent en contact avec les **filaments intermédiaires** du cytosquelette (la kératine, par exemple).

– les *hémidesmosomes* et les *points de contact focaux* sont des dispositifs ponctuels d'accrochage des cellules épithéliales sur leur lame basale ; ils relient respectivement les filaments intermédiaires et les microfilaments du cytosquelette à cette dernière grâce à des protéines transmembranaires (intégrines).

• **Les jonctions communicantes** (jonctions dites « gap ») **et les plasmodesmes :** les premières sont spécifiques des cellules animales ; il s'agit de structures en forme de disques disposés en vis-à-vis dans chaque cellule, formés d'une multitude de petits **canaux** juxtaposés constitués de protéines transmembranaires. Elles permettent le passage d'ions et de molécules de taille inférieure à 1 000 Daltons. Les seconds sont des dispositifs d'échange entre cytoplasmes spécifiques des Végétaux.

# II Cryofracture et cryodédapage

Ces techniques de microscopie électronique permettent l'observation cytologique de tissus massifs dont elles donnent une vue interne très différente de celle obtenue par les coupes conventionnelles, en particulier en ce qui concerne les membranes.

• **Principe :** on réalise une fixation « physique » de l'échantillon : le matériel biologique est congelé très rapidement et à très basse température (azote liquide : – 196 °C), de façon que des cristaux de glace n'aient pas le temps de se former (**vitrification**). Le bloc congelé est ensuite cassé grâce à un petit marteau, et non coupé ; on obtient ainsi une **surface de fracture** de l'échantillon, qui n'est pas plane mais rugueuse. La géométrie de cette surface est localement déterminée par la résistance mécanique de la matière rencontrée et la forme des structures fracturées.

• **Les répliques :** le problème technique consiste à visualiser les plus fins détails de cette surface irrégulière au moyen d'un microscope électronique. Grâce au protocole d'ombrage métallique (cf. fiche 11), réalisé de façon unilatérale et sous un angle assez incliné, on recouvre la surface de l'échantillon par un très **fin film de métal** (or, platine), toujours à très basse température évidemment.
Une **couche de carbone**, lui aussi vaporisé sous vide, permet ensuite de combler les zones de la surface non atteintes par le métal et de renforcer la pellicule ainsi réalisée. Ce très fin moulage de la surface, appelé **réplique**, est ensuite décollé de l'échantillon après décongélation, soigneusement nettoyé et enfin déposé sur une grille de microscope électronique pour une observation en transmission.

• **Les images :** le métal s'étant accumulé plus ou moins fortement selon les reliefs de la surface, il constitue un obstacle plus ou moins grand aux électrons, ce qui permet de donner une image en relief des structures. Les premières images fournies par cette technique ont complètement dérouté les observateurs, car l'aspect granuleux des membra-

nes était inattendu, compte tenu des modèles membranaires ayant cours avant l'époque de sa mise au point.

• **L'observation des membranes :** de façon générale, celles-ci sont des zones de fragilité et la cassure passe très souvent à l'intérieur des **bicouches lipidiques** ; les organites sphériques sont arrachés ou « scalpés » et ils apparaissent alors sous la forme de creux ou de bosses. De même, à l'intérieur des membranes, les protéines membranaires se présentent sous la forme de globules en relief ou de petits creux, lorsqu'elles ont été arrachées de la bicouche.

## Échanges entre cellules confluentes

Une **culture de cellules animales** a été conduite jusqu'à ce que pratiquement toutes les cellules recouvrent le fond de la boîte de Petri (cellules dites en monocouche confluente). À l'aide d'une microseringue pilotée par un micromanipulateur associé à un microscope inversé, il est possible d'injecter un volume de liquide de quelques nanolitres dans une seule cellule vivante, et ceci sans la détériorer.
Afin d'étudier le type de relations établies entre des cellules étroitement jointives, les expériences suivantes ont été effectuées :
1) Une solution de **glycine** (un acide aminé, de masse moléculaire 75 Da) radioactive a été injectée dans une cellule et la présence de cet acide aminé dans les cellules voisines a été détectée 5 minutes après l'injection, grâce à la technique autoradiographique : fixation des cellules, dépôt d'une émulsion photosensible sur les cellules fixées et révélation après une semaine d'exposition (cf. fiche 17).
2) Une solution de **fluorescéine** (une molécule fluorescente = fluorochrome, de masse moléculaire 332 Da) a été injectée de la même façon, et la présence de cette molécule dans les cellules voisines a été directement visualisée 5 minutes après l'injection grâce à un microscope à fluorescence (cf. fiche 8).
3) Une solution de **peroxydase de raifort** (une enzyme, dont la masse moléculaire est de 40 000 Da, produisant une réaction vivement colorée dans des cellules vivantes, si on leur fournit un substrat approprié) a été injectée de la même façon, et la présence de l'enzyme dans les cellules voisines a été observée 5 minutes après l'injection grâce à un microscope photonique classique (cf. fiche 2).
À titre de témoin dans chaque expérience, quelques cellules complètement séparées du lot étudié, c'est-à-dire sans connexions directes ou indirectes avec la cellule injectée, ont été étudiées de la même façon.
Les résultats obtenus sont les suivants :
– pour la glycine radioactive, un grand nombre de cellules disposées de façon concentrique autour de celle injectée, mais n'ayant pas nécessairement de rapport direct avec elle, donnent une réponse positive à l'autoradiographie ;

– pour la fluorescéine, seules les quelques cellules immédiatement en contact avec la cellule injectée montrent une fluorescence verte ;
– pour la peroxydase, seule la cellule injectée montre une coloration spécifique de la réaction que cette enzyme catalyse ;
– dans tous les cas, une cellule n'ayant aucun contact direct ou indirect avec la cellule injectée ne donne jamais de réponse positive.
Quelles explications pouvez-vous donner à cet ensemble de résultats et quelles autres expériences proposez-vous pour vérifier vos hypothèses ?

## Solution

**1.** Ces expériences montrent clairement que les cellules en culture, lorsqu'elles sont jointives, sont **capables d'échanger des molécules cytosoliques** ; néanmoins, l'intensité de ces échanges diffère selon le type de molécule étudié.
**2.** Il est clair que **la masse moléculaire est un facteur déterminant** : une petite molécule, comme la glycine, passe très facilement d'une cellule à l'autre, tandis qu'une macromolécule, comme la peroxydase, reste confinée dans le cytoplasme de la cellule où on l'a injectée. La fluorescéine présente une situation intermédiaire, car au bout du même temps, seules les cellules les plus proches de celle injectée ont récupéré cette molécule.
**3.** Ceci suggère l'hypothèse d'une barrière intercellulaire fonctionnant sur le mode d'un tamis, c'est-à-dire par une **sélection sur la taille**. Le fait que des cellules isolées ne puissent recevoir la molécule injectée montre qu'il ne s'agit pas d'un simple passage de type perméation (utilisant des transporteurs ou non ; cf. fiche 4) à travers la membrane plasmique, et ensuite par l'intermédiaire du milieu extracellulaire.
**4.** Ces résultats suggèrent donc l'existence de canaux transmembranaires faisant communiquer directement les cytoplasmes de deux cellules voisines. L'observation en **microscopie électronique** des membranes latérales de ces cellules jointives, en particulier au moyen de la technique de cryofracture/cryodécapage, montre la présence des nombreux et minuscules canaux (les connexons) organisés en disques, et constituant les **jonctions communicantes**.
**5.** Des expériences électrophysiologiques (cf. fiche 29), qui consistent à **mesurer un courant électrique** circulant entre deux électrodes plantées dans deux cellules distinctes, est aussi un moyen de montrer l'existence directe d'un flux important d'ions entre elles. On sait que les cellules musculaires cardiaques coordonnent leur contraction grâce à des échanges ioniques assurés par ces jonctions communicantes, et qu'il en est de même pour la différenciation des cellules embryonnaires.

# Calcium et jonctions intercellulaires

Une lignée de cellules de rein (cf. fiche 14) forme en culture un **épithélium** serré semblable à celui obtenu dans l'organisme, avec une polarisation apico/basale des cellules très nette et des jonctions sur leurs faces latérales tout à fait identiques. On dispose de **liposomes marqués** avec des lipides fluorescents, et il est possible de les faire fusionner *in vitro* avec ces cellules en culture.
Deux expériences sont réalisées :
1) Les liposomes marqués sont mis en contact avec les cellules épithéliales dans leur milieu de culture habituel.
2) Ces mêmes liposomes sont mis en contact avec les cellules, mais dans un milieu dépourvu en $Ca^{2+}$, condition expérimentale bien connue pour provoquer la dissociation des cellules.
L'observation ultérieure des cellules avec un microscope à fluorescence montre que, dans la première expérience, seule la **face apicale des cellules** est visible, alors que dans la deuxième, **l'ensemble de la membrane plasmique** est devenu fluorescent.
Comment interprétez-vous ces observations ?

## Solution

**1.** Lorsque l'épithélium est intact, les liposomes introduisent des lipides marqués uniquement dans la bicouche de la partie apicale des cellules. L'observation montre que ceux-ci restent confinés dans cette zone, car seule la membrane apicale des cellules est devenue fluorescente. Or, en raison de la **fluidité membranaire** très importante pour les lipides, on pourrait penser que les lipides marqués puissent rejoindre le domaine membranaire basolatéral.
**2.** Lorsque les cellules sont dissociées, les liposomes peuvent introduire des molécules marquées dans tous les domaines membranaires, et la fluorescence concerne alors toute la cellule. Ces résultats démontrent clairement l'existence d'une **barrière de diffusion latérale** des lipides (qui concerne aussi les protéines), située dans la partie apicale du domaine basolatéral, et constituée par les jonctions étanches, dites aussi "serrées". Cette barrière est responsable de la régionalisation des protéines membranaires, qui permet la **polarité fonctionnelle** de ces cellules.

FICHE 7

# Le rôle architectural du cytosquelette

## I Les réseaux cytosquelettiques des cellules animales

Le cytoplasme des cellules eucaryotiques est parcouru par plusieurs réseaux denses de filaments et de tubules qui leur confèrent leur solidité, organisent leur cytoplasme et participent à la localisation des organites ; ils y assurent également des fonctions dynamiques (cf. fiche 8). On rappelle que ces réseaux sont en rapport direct avec les jonctions intercellulaires (cf. fiche 6). La notion de **cytosquelette** n'a été dégagée qu'à la fin des années 1970, grâce aux perfectionnements des techniques **d'immunodédection,** même si ses éléments constitutifs avaient été observés au microscope électronique depuis les années 1960.

**• Les réseaux cytosquelettiques** sont aisément observables grâce à l'utilisation de l'immunofluorescence, qui présente l'intérêt de les mettre en évidence à l'échelle de la cellule entière, et permet donc de mesurer leur importance réelle. Dans les cellules animales, le réseau de **microtubules** qui remplit le cytoplasme rayonne à partir d'un centre organisateur généralement situé à proximité du noyau, le centrosome ; les **microfilaments** se rencontrent généralement dans la zone corticale des cellules, où ils se présentent sous la forme de câbles rigides et souvent tendus d'un côté à l'autre de la cellule ; enfin, un troisième réseau (absent des cellules végétales), celui des **filaments intermédiaires**, plus sinueux que celui des microtubules, parcourt en tous sens le cytoplasme, sans qu'aucun centre organisateur soit décelable.

**• Les molécules et les structures cytosquelettiques :**

- les *microtubules* sont des tubes de 25 nm de diamètre, formés de molécules globulaires de **tubuline** (dimères $\alpha\beta$) organisées en 13 protofilaments polarisés disposés parallèlement les uns aux autres ;
- les *microfilaments* sont formés de molécules globulaires d'**actine** disposées les unes à la suite des autres pour former une sorte d'hélice de 7 nm d'épaisseur, elle aussi structuralement et fonctionnellement polarisée ;
- les *filaments intermédiaires* sont constitués de molécules fibreuses (de type **kératine** dans les cellules épithéliales) entortillées les unes autour des autres à la manière d'un cordage de 9 à 11 nm d'épaisseur.

Les propriétés de ces trois types de filaments sont très différentes, les deux premiers étant particulièrement dynamiques alors que le dernier est au contraire très stable.

## II Les techniques de détection immunocytochimiques

Ces techniques de détection cytologique de protéines individuelles (et donc des structures qui les contiennent) sont un outil d'analyse très puissant. Elles utilisent le principe d'une reconnaissance spécifique entre un anticorps et la protéine contre laquelle il est dirigé : l'antigène ; on parle alors de complexe immun. L'injection répétée de l'antigène chez un Mammifère (lapin, chèvre) provoque la fabrication, dans le sérum de ce dernier (grâce à ses lymphocytes B) d'un mélange d'immunoglobulines spécifiques de chacun des épitopes de l'antigène. On parle d'anticorps polyclonaux car ce sérum contient un mélange d'anticorps fabriqués par différents lymphocytes B, après sélection clonale.

**• Le marquage des anticorps :** différentes molécules (marqueurs) sont greffées aux anticorps, ce qui permet de les visualiser au microscope :

- quand ils sont marqués grâce à des **colorants fluorescents** tels que la fluorescéine ou la rhodamine (fluorochromes), il est possible de visualiser *in situ* les complexes immuns grâce à un microscope à fluorescence (cf. fiches 7 et 8) ;
- lorsque de minuscules **billes d'or colloïdal** de quelques nm de diamètre (très opaques aux électrons) leur sont fixées, on utilise le microscope électronique ;
- si on leur greffe des **enzymes** telles que la phosphatase alcaline, on peut obtenir des sensibilités de réponse très élevées. En effet, lorsque celle-ci est mise en présence d'un substrat approprié, elle produit du phosphate inorganique qui est visualisé à travers une réaction colorée. L'accumulation des produits de réaction étant proportionnelle au temps d'incubation, des quantités infimes de complexe immun et de protéine cible peuvent donc être détectées au microscope photonique.

**• L'immunocytochimie indirecte :** bien qu'il soit possible de marquer les anticorps directement dirigés contre la protéine cible, nommés **anticorps primaires** (AC I), les performances de la technique sont grandement améliorées lorsqu'on utilise le principe de l'immunocytochimie indirecte. Des **anticorps dits secondaires** (AC II) reconnaissant très spécifiquement les AC I sont alors mis en œuvre ; ils sont fabriqués, de façon classique, chez une autre espèce d'animal que celle qui a servi à obtenir l'AC I, par injection d'immunoglobulines de ce dernier (qui se comportent à leur tour comme des antigènes).

Le protocole de détection consiste donc à mettre en présence la protéine-cible avec l'AC I non marqué, pour former le complexe immun, ce dernier étant ensuite mis en

présence de l'AC II marqué, qui se fixe alors sur l'AC I. Comme plusieurs molécules d'AC II marqué se fixent sur une seule molécule d'AC I, ceci conduit à une forte amplification du signal par rapport à la méthode directe initialement présentée.

## Structures cytosquelettiques stables

Le cytosquelette des cellules animales participe à l'organisation **d'édifices stables** associés aussi bien à l'architecture qu'à la dynamique cellulaires.
Répondre par Vrai ou Faux aux propositions suivantes qui illustrent cet aspect fonctionnel du cytosquelette.
**1.** Les **centrioles** sont de minuscules cylindres dont les génératrices sont constituées de 9 filaments d'actine groupés par 3 et disposés parallèlement à leur axe.
**2.** L'axonème des **cils et des flagelles** comprend neuf doublets de microtubules, ainsi qu'une paire centrale de microtubules.
**3.** Les **corpuscules basaux**, ou cinétosomes, sont situés à la base des microvillosités rencontrées dans les cellules absorbantes telles que les entérocytes.
**4.** L'axe des **microvillosités** est renforcé par des filaments intermédiaires, très stables, et dont le rôle est de les maintenir dressées.
**5.** Les myofibrilles des cellules (fibres) musculaires striées sont constituées d'une succession de **sarcomères** formés d'actine et de myosine.
**6.** Les **neurotubules** des axones des cellules nerveuses sont des microtubules qui transportent dans leur lumière les neuromédiateurs, à destination des synapses.
**7.** La **lamina nucléaire** est constituée de protéines de type filaments intermédiaires, et elle est associée à la membrane nucléaire interne, du côté interne.

## Solution

**1. Faux** : les centrioles, qui vont toujours par paire dans les cellules (pour former un centrosome), sont constitués de 9 triplets de microtubules disposés parallèlement à leur grand axe ; les centrosomes sont des centres organisateurs de microtubules.
**2. Vrai** : les 9 doublets sont réunis longitudinalement par diverses protéines telles que la dynéine ou la nexine ; ils sont aussi associés à la paire centrale par des fibres.
**3. Faux** : ils ont la même organisation que des centrioles, mais sont situés à la base des cils et des flagelles ; ils sont en continuité avec les microtubules de l'axonème.
**4. Faux** : leur axe est consolidé par des microfilaments d'actine organisés en un faisceau serré, et ancrés dans leur membrane apicale par leur extrémité +.
**5. Vrai** : les sarcomères sont les unités de contraction de la myofibrille ; le glissement des faisceaux de myosine sur l'actine est responsable de la contraction.
**6. Faux** : les neurotubules ont un rôle architectural ; aucune molécule ne circule dans leur lumière. En revanche, des moteurs moléculaires les utilisent à cet effet.

**7. Vrai** : il s'agit des seuls éléments cytosquelettiques qui ne soient pas cytosoliques.

## Polymérisation *in vitro* de la tubuline

Lorsque des dimères αβ de tubuline sont mis en solution en présence de GTP, à 37 °C, on peut observer au spectrophotomètre une variation importante de la **diffusion de la lumière** transmise à travers l'échantillon ; l'évolution au cours du temps (analyse cinétique) de cette diffusion est représentée dans le graphe 1.
De plus, lorsque le contenu du tube est analysé en microscopie électronique par la technique de coloration négative (cf. fiche 11), on observe que cette variation est due à **l'apparition de microtubules** au sein de la solution.

**1.** Pourquoi l'apparition des microtubules peut-elle se traduire par une variation de la diffusion de la lumière ?

**2.** Comment appelle-t-on ce phénomène spontané d'apparition des microtubules ?

**3.** Comment peut-on expliquer la présence des trois phases vues dans la courbe ?

La **concentration initiale** en tubuline est un facteur important dans ce processus : la phase de plateau est atteinte d'autant plus rapidement (et sa valeur est d'autant plus faible) que cette concentration initiale est elle-même faible. Enfin, on montre qu'il existe encore de la tubuline libre dans le milieu, même quand le plateau est atteint.

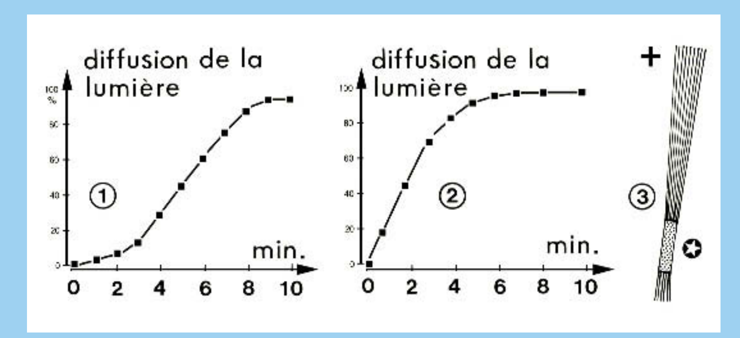
**4.** Comment interprétez-vous ces observations ?

Lorsque de courts fragments de microtubules ou de courts fragments d'axonèmes de cils ou de flagelles (**amorces**) sont introduits dans la solution de dimères, on obtient la cinétique représentée dans le graphe 2.

**5.** Après comparaison des deux courbes, proposez une interprétation pour ce fait.

Si l'on utilise des amorces « marquées » (étoile) de sorte qu'on puisse les reconnaître en microscopie électronique, on observe les images données dans la figure 3.

**6.** Quelle information peut-on tirer de cette dernière observation ?



# Solution

**1.** Une solution vraie de protéines se caractérise par une certaine **absorbance** (Densité Optique, ou DO) ; si des structures de grande taille telles que des microtubules apparaissent au sein de cette solution, on imagine aisément qu'elles ne diffusent pas la lumière de la même façon que des protéines solubles ; on parle alors de **turbidité**. Il existe une relation directe entre la concentration en microtubules et la DO que permet de mesurer le spectrophotomètre (turbidimétrie).

**2.** Ce phénomène spontané, *in vitro*, porte le nom **d'autoassemblage**. Ce concept est très important, car il concerne un nombre considérable de processus : genèse des membranes ou de particules complexes telles que des ribosomes, des virus, etc.

**3.** La courbe présente une forme caractéristique en S (forme dite sigmoïde) :

- la première phase, la plus lente car la plus complexe, consiste à fabriquer de très **courts microtubules,** à partir des dimères en solution. Une concentration élevée en tubuline libre est indispensable pour que ces petites structures, qui résultent au départ de la **rencontre aléatoire des molécules**, soient formées et acquièrent une certaine stabilité grâce à des liaisons intermoléculaires de plus en plus nombreuses.
- Ces amorces une fois formées, **il suffit de les allonger**, d'un côté ou de l'autre, en ajoutant des dimères de tubuline aux extrémités des protofilaments générés au cours de l'étape précédente. Cette deuxième phase progresse de façon linéaire et rapide tant qu'il existe de la tubuline libre en concentration suffisante dans le milieu.
- La dernière phase, marquée par l'apparition du plateau, correspond au **ralentissement** du phénomène. En fait, la concentration en tubuline libre dans le tube (qui en contient une quantité finie) devient de plus en plus faible, et l'apport de tubuline aux extrémités est donc de moins en moins efficace pour l'allongement.

**4.** Si la quantité de tubuline au départ est très élevée, on pourra former une quantité de microtubules (ou allonger un nombre donné de microtubules) d'autant plus grande avant d'atteindre le plateau. Comme l'allongement se fait à **vitesse constante** dans une certaine gamme de concentrations, le plateau sera atteint plus ou moins vite. Si l'on observe une certaine concentration en tubuline libre, même lorsque des microtubules ne se forment plus, c'est que le phénomène résulte d'un **équilibre** entre molécules liées aux extrémités des microtubules et molécules libres en solution.

**5.** Lorsque des amorces artificielles sont utilisées, on court-circuite la phase initiale, dite de **nucléation**, et on démarre tout de suite dans la phase linéaire d'allongement.

**6.** Les deux extrémités des microtubules ne s'allongent pas à la même vitesse (la plus rapide est notée +) ; ceci montre la **polarité fonctionnelle** de ces structures.

FICHE 8

# Les rôles dynamiques du cytosquelette

## I Les mouvements cellulaires

À côté de son rôle architectural, le cytosquelette possède un grand nombre de fonctions dynamiques concernant aussi bien les mouvements internes à la cellule que ses déformations ou son déplacement. Les microtubules et les microfilaments d'actine, présents chez tous les Eucaryotes, sont responsables de ces fonctions.

• **Le positionnement et les déplacements des organites :** la plupart d'entre eux (le réticulum endoplasmique, les saccules golgiens, les mitochondries) sont arrimés sur des microtubules grâce à des **moteurs moléculaires**, qui assurent en outre leurs déplacements contrôlés en fonction des étapes du cycle cellulaire (cf. fiche 14) ou des besoins physiologiques locaux. Les mouvements des multiples vésicules qui font communiquer les compartiments membranaires entre eux, ou qui permettent l'endocytose et l'exocytose (cf. fiche 5) sont aussi assurés par le cytosquelette. La cyclose chez les végétaux relève aussi de ces mécanismes.

• **Lors de la division cellulaire,** la mise en place de **l'appareil mitotique** mobilise toute la tubuline interphasique jusque-là organisée en microtubules rayonnant autour du centrosome (cf. fiche 7). Cette structure très complexe participe à la bonne séparation des chromatides sœurs (ou des chromosomes homologues lors de la méiose I) lors de la mitose. La cytodiérèse des cellules animales met en œuvre un **dispositif annulaire contractile**, formé d'actine et de myosine, dont le rôle est de séparer en deux le cytoplasme de la cellule en fin de division.

• **Les déformations cellulaires :** elles impliquent le **couple actine/myosine** et sont mises en œuvre lors de la contraction des cellules musculaires ou lors du repliement des épithéliums, phénomène fréquent lors de l'embryogenèse. Lors des déplacements des cellules isolées (cellules embryonnaires mobiles, cellules tumorales, cellules animales en culture, amibes…), diverses structures à base d'actine sont utilisées, telles que les lamellipodes ou les pseudopodes ; les points de contact focaux (cf. fiche 6) leur permettent de s'accrocher transitoirement au support et servent de point d'appui.

• **Les structures locomotrices spécialisées :** les cils et les flagelles, qui sont rencontrés chez les Protistes ou chez de nombreuses cellules animales (épithéliums bronchique et de l'oviducte, ou spermatozoïdes, par exemple), sont constitués de microtubules organisés en **axonèmes** (cf. fiche 7).

## II L'immunofluorescence ; le microscope à épifluorescence

L'immunofluorescence est un protocole d'immunodétection cytologique (cf. fiche 7) dans lequel la visualisation des anticorps se fait au moyen de **fluorochromes**. Cette technique nécessite l'utilisation d'un microscope dit à **épifluorescence,** qui se distingue des microscopes classiques en ce sens que la lumière éclairant l'échantillon traverse l'objectif et arrive « par le dessus », tandis que la lumière réémise par ce dernier suit le trajet inverse avant d'atteindre les oculaires. Ce dispositif permet de ne pas contaminer la faible lumière émise par l'échantillon par une lumière violente provenant de la source, lors de la formation de l'image.

• **Les fluorochromes** sont des molécules de petite taille capables d'absorber certaines longueurs d'onde de la lumière et de réémettre une lumière de moindre énergie et donc de longueur d'onde plus élevée : c'est le principe de la **fluorescence**. Certaines molécules naturelles, comme les chlorophylles, possèdent cette propriété.
Les fluorochromes les plus classiques et les plus anciennement utilisés, sont la **fluorescéine** et la **rhodamine** qui absorbent respectivement à 490 nm (bleu) et 550 nm (vert), et réémettent à 512 nm (jaune vert) et 580 nm (rouge orangé) ; ces molécules sont très aisément greffées de façon covalente aux anticorps, sans que les propriétés spécifiques de reconnaissance de ces derniers soient modifiées. Un très grand nombre de fluorochromes sont actuellement disponibles pour les cytologistes.

• **Le problème technique** rencontré dans un microscope à épifluorescence consiste à séparer la lumière émise par la lampe (excitatrice) de la lumière réémise par l'échantillon. Ceci se réalise grâce à un **miroir dichroïque** dont la propriété est de réfléchir certaines longueurs d'onde tout en laissant passer d'autres, plus longues. Différents filtres sont intercalés sur le trajet de la lumière (très souvent dans l'ultra-violet), permettant ainsi d'utiliser une large gamme de fluorochromes, caractérisés chacun par un ou plusieurs pics d'absorption et d'émission bien distincts.

• **Le microscope à épifluorescence** permet également de visualiser toutes les **sondes métaboliques** fluorescentes (cf. fiche 19), ainsi que la **GFP** (green fluorescent protein ; cf. fiche 28). Il est aussi souvent associé à des instruments nommés « microscope confocal », ou « microscope à déconvolution », dont les principes sont décrits dans la fiche 13.

# Les microtubules dynamiques en interphase

Les cellules animales en culture présentent un cytosquelette interphasique typique, montrant en immunofluorescence une multitude de microtubules rayonnant à partir du centrosome (qui est situé à côté du noyau, non dessiné ; Figure 1). En présence de colchicine (une drogue extraite d'une plante : le colchique), on observe que tous ces microtubules disparaissent, à l'exception de leurs racines, ancrées dans un territoire proche du centrosome, et de ceux présents dans les centrioles eux-mêmes (Figure 2)

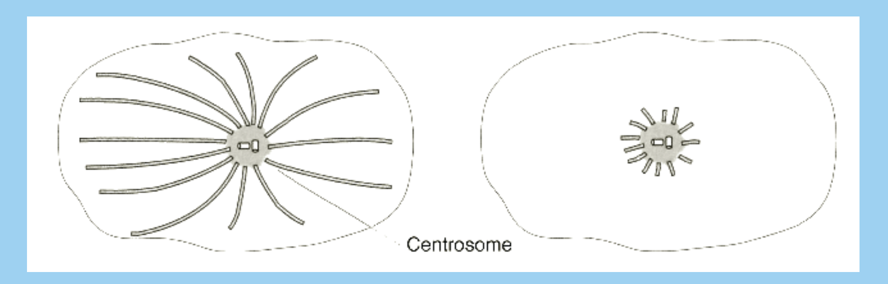



Figure 1 Figure 2

**1.** Quelles hypothèses peut-on formuler concernant l'action de la colchicine ?

Avec une micro-seringue, il est possible d'injecter dans ces cellules de la tubuline chimiquement modifiée, mais toujours capable de former des microtubules. Des anticorps spécifiques contre cette forme de tubuline ont été obtenus, ce qui permet de connaître son devenir dans la cellule après injection, par immunofluorescence (pointillés). Une première analyse est conduite **2** minutes après l'injection, et une seconde après **30** minutes. Les images obtenues sont données dans les Figures 3 et 4.

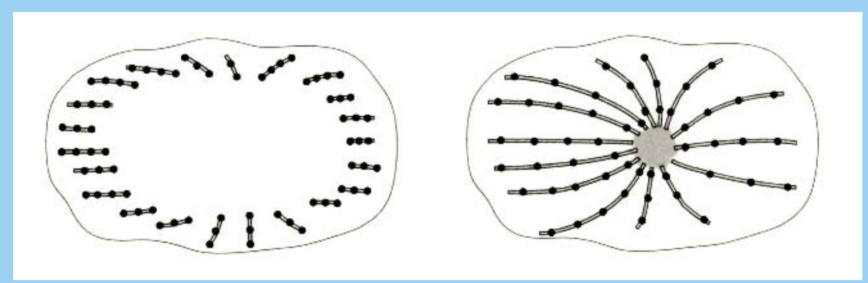


Figure 3 Figure 4

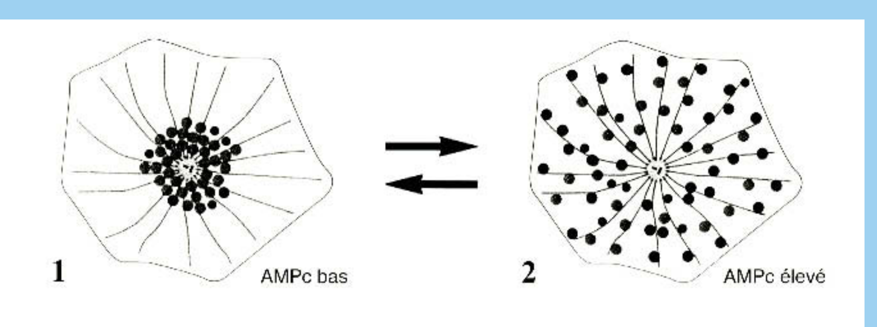
**2.** Comment interprétez-vous ces résultats expérimentaux, et comment éclairent-ils les observations faites avec la colchicine ? Quelle conclusion générale peut-on tirer concernant le fonctionnement des microtubules dans ces cellules ?

## Solution

**1.** Une première hypothèse est que les microtubules sont des **structures stables** dans les cellules, et que la colchicine les détruit complètement ; mais dans ce cas, on explique mal pourquoi leurs « racines » centrosomiques et les centrioles ne sont pas affectés. Une seconde hypothèse est que les microtubules sont des structures dynamiques, **en perpétuel renouvellement**, et que la drogue empêche leur formation après qu'ils se soient spontanément dépolymérisés. Dans ce cas, les microtubules persistants appartiendraient à des structures stables.
**2.** Après 2 min, seules les extrémités des microtubules sont détectées par l'anticorps spécifique de la tubuline marquée qui a été injectée. Ceci montre que l'allongement de ces structures (ou polymérisation) se fait par **leur extrémité**, et non pas par intercalation le long de microtubules déjà constitués. Après 30 min, en revanche, ils apparaissent **marqués sur toute leur longueur** ; ceci ne peut être expliqué que s'ils se sont spontanément détruits dans l'intervalle, et qu'ils se sont repolymérisés avec un mélange de tubuline endogène (qui a été libérée) et de tubuline injectée.
Cette interprétation permet de comprendre **l'action de la colchicine**. Celle-ci se fixe sur la tubuline libre cytoplasmique, libérée en permanence par les microtubules qui se dépolymérisent spontanément ; cette fixation rend alors la tubuline incapable de former de nouveaux microtubules, ce qui conduit rapidement à leur disparition quasi complète. Dans ce modèle, les seuls microtubules restant visibles sont ceux qui sont stables, et que l'on rencontre à proximité ou dans les centrosomes. L'ensemble de ces expériences montre que tous les microtubules interphasiques rayonnants sont **très dynamiques** et en constant renouvellement.

## Les moteurs liés aux microtubules

Le déplacement de la plupart des cellules flagellées est bloqué par les sels de **vanadium**. On a montré *in vitro* que ces sels ont pour cible les enzymes de type **ATPases**, dont elles inhibent le fonctionnement. La principale ATPase isolée à partir des axonèmes flagellaires est la dynéine, un énorme complexe protéique qui relie les **doublets de microtubules** périphériques entre eux ; elle est bien visible en microscopie électronique, par cryofracture (cf. fiche 6).
**1.** Quel lien établissez-vous entre toutes ces données ? Quel autre système dynamique connaissez-vous, dont le fonctionnement est voisin de celui décrit ici ?
Chez de nombreux animaux (les poissons, par exemple), on connaît un phénomène de mimétisme dû à la présence dans leur épiderme de cellules spécialisées : les **chromatophores**. Ces cellules très aplaties contiennent dans leur cytoplasme une multitude de granules de pigment pouvant rapidement changer de localisation : s'ils sont concentrés au centre de la cellule (fig. 1), celle-ci apparaît globalement claire, mais s'ils sont distribués dans tout le cytoplasme, elle apparaît foncée (fig. 2).




Il a été montré, *in vitro*, que **l'étalement des granules** peut être provoqué par l'AMP cyclique (une molécule de signalisation ; cf. fiche 28), tandis que leur regroupement se fait en son absence. Si l'on ajoute du vanadate dans le milieu, on observe que l'AMP cyclique provoque toujours le déplacement des granules vers la périphérie, tandis qu'en son absence leur **déplacement vers le centre** de la cellule n'a plus lieu.
**2.** Quelle hypothèse pouvez-vous formuler concernant le déplacement des granules ?
L'observation de l'organisation des microtubules de ces cellules (fig. 1) montre une disposition rayonnante dans le cytoplasme, insensible à l'action de l'AMP cyclique.
**3.** En quoi cette nouvelle donnée renforce-t-elle votre hypothèse ?

## Solution

**1.** Tout mouvement nécessite de l'énergie, or on sait que l'**hydrolyse enzymatique de l'ATP** (réaction très exergonique ; cf. fiche 21) est aussi associée à des fonctions mécaniques. Le couplage est assuré par des **changements de conformation** des protéines liés à la fixation de l'ATP, de l'ADP et du Pi, ainsi qu'à l'établissement de **liens physiques entre protéines** qui se déplacent alors les unes par rapport aux autres. L'exemple le plus anciennement connu est celui du glissement de la myosine sur les microfilaments d'actine dans le **muscle strié**.
**2.** Compte tenu de ce qu'on sait chez les cellules flagellées, et puisque le vanadate bloque le déplacement normal des granules vers le centre de la cellule, en absence d'AMP cyclique, on peut faire l'hypothèse qu'une protéine fonctionnant comme la dynéine axonémale (cf. fiche 7) est mise en jeu.
**3.** La disposition des microtubules (stables en absence d'AMP cyclique) renforce l'hypothèse d'une interaction entre granules et cytosquelette. En fait, la dynéine est le prototype des **moteurs microtubulaires** : elle permet non seulement le glissement des microtubules les uns par rapport aux autres dans l'axonème, mais aussi le déplacement des organites cytoplasmiques (vers l'extrémité – des microtubules).

FICHE 9

# L'organisation du noyau ; la chromatine

## I Le noyau interphasique et la chromatine

Le noyau est le plus gros des organites des cellules eucaryotiques ; généralement unique, il est parfois absent (hématies des Mammifères) ou présent en plusieurs exemplaires (cellules musculaires striées squelettiques). De forme le plus souvent sphérique, il peut être plurilobé, lenticulaire (cellules végétales vacuolisées) ou allongé (spermatozoïdes). Après coloration, son aspect est le suivant : à l'intérieur d'une « membrane » qui le limite, une substance granuleuse dense et très colorable, la chromatine, baigne dans une solution incolore : le nucléoplasme. Un ou plusieurs nucléoles, de forme sphérique y sont également observables (cf. fiche 10).

• **En microscopie électronique,** on observe **deux membranes** limitantes formant une enveloppe percée d'orifices : les complexes des **pores nucléaires**. La **chromatine** apparaît formée de deux constituants : la chromatine diffuse (ou euchromatine), formée de fibres entrelacées de 30 nm d'épaisseur, et la chromatine dense (hétérochromatine), organisée en paquets souvent volumineux et plaqués contre la membrane interne. La **lamina** (cf. fiche 9) double cette dernière du côté interne, permettant l'ancrage des complexes des pores et le lien avec la chromatine.

• **La chromatine** est un complexe formé d'ADN et de protéines diverses, parmi lesquelles les plus abondantes sont les **histones** ; ces petites protéines basiques forment avec l'ADN des structures globulaires appelées **nucléosomes**. Le brin de chromatine s'organise lui-même en un solénoïde dont chaque tour comporte 6 nucléosomes, et dont le diamètre est de 30 nm (formant l'euchromatine).
D'autres protéines peu abondantes, mais fondamentales (dites **protéines non-histones**), y sont associées, permettant son activité : enzymes intervenant dans la réplication et la réparation de l'ADN, la transcription, facteurs de transcription… La chromatine peut être compactée de façon encore plus importante par repliement du brin élémentaire en boucles pontées à leur base et formation d'une hélice d'ordre supérieur ; la structure

obtenue (l'hétérochromatine) rappelle l'organisation des chromosomes métaphasiques (cf. fiche 12).

## II L'électrophorèse des protéines

Les protéines natives (telles qu'elles existent, en solution, dans les cellules), sont des macromolécules **électriquement chargées** et donc susceptibles de se déplacer dans un champ électrique, ce qui permet de les séparer **par électrophorèse**. Une cuve à électrophorèse comprend deux bacs contenant une solution saline, dans lesquels plongent des électrodes reliées à un générateur de courant continu ; l'échantillon de protéines est déposé sur un **support poreux** (gel, feuille de papier) imbibé de la même solution et disposé entre les deux bacs de sorte que le courant électrique puisse circuler d'une électrode à l'autre. En fonction de sa charge nette, une molécule donnée se dirigera vers l'électrode de signe opposé : charge + vers électrode – (cathode), et inversement.
Deux types d'électrophorèse sont décrits :

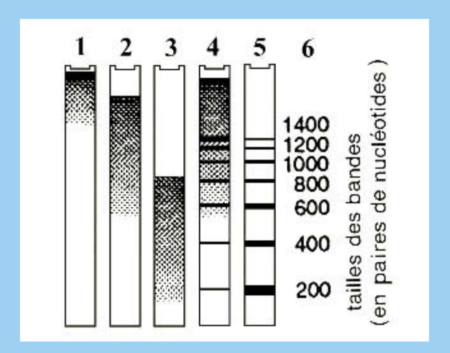
• **l'électrophorèse native :** elle nécessite un **support très poreux**, qui ne gêne pas le déplacement des protéines ; celles-ci se déplacent en fonction de leur charge électrique globale et de leur masse, la première faisant office de « moteur », la seconde tendant à les ralentir. Cette combinaison des deux paramètres assure un déplacement qui n'a donc rien à voir avec la taille des molécules elles-mêmes. Les protéines à analyser sont déposées à mi-chemin entre les deux électrodes.

• **l'électrophorèse dénaturante :** elle se réalise sur des protéines traitées par un détergent ionique (le sodium dodécyl sulfate, ou **SDS**), qui a pour propriété de se fixer solidement sur leurs domaines hydrophobes. Ce phénomène a de multiples conséquences sur les caractéristiques des protéines : 1) elles se dénaturent (c'est à dire se déroulent, changent de conformation), en même temps que leurs sous-unités (dans le cas des protéines oligomériques) se séparent, et 2) elles sont chargées négativement en proportion de leur taille (masse).

• **Le rapport « charge/masse »** étant alors le même pour toutes les chaînes polypeptidiques, leur déplacement se fera en fonction de leur seule masse à condition que l'on ait choisi de les faire migrer dans un gel à maille serrée (gel de polyacrylamide), qui fonctionne comme un **tamis moléculaire**. Comme toutes les chaînes migrent vers l'anode (+), l'échantillon étudié est déposé à proximité de la cathode et la vitesse de déplacement des molécules (et donc leur distance de migration) est inversement proportionnelle à leur taille.
On fait toujours migrer, en parallèle des échantillons, des protéines de masse moléculaire connue (**marqueurs**) afin de déterminer celle des protéines inconnues analysées. Le **gel doit enfin être coloré** de manière à visualiser les protéines.

# Organisation de la chromatine

Il est possible, au moyen d'un protocole de fractionnement cellulaire (cf. fiche 15), d'obtenir une fraction hautement purifiée de noyaux intacts de cellules de foie de rat. On peut ensuite les faire éclater délicatement en présence de détergents doux et en extraire la chromatine déroulée et dans un état de préservation optimal.
Cette chromatine est traitée de deux manières différentes :
1) après déprotéinisation (au moyen de protéases), l'ADN est extrait puis digéré par une ADNase bactérienne (extraite de *Micrococcus*) pendant 1 et 5 minutes ; enfin, l'ADN digéré est soumis à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide ;
2) la chromatine elle-même est traitée directement par l'ADNase, dans les mêmes conditions, puis déprotéinisée pour en extraire l'ADN ; ce dernier est soumis à l'électrophorèse comme dans l'expérience précédente.
Les résultats de ces électrophorèses sont donnés dans la figure suivante :
**canal 1** : ADN extrait, « nu » et non digéré ; **canaux 2 et 3** : ADN « nu » digéré (1 et 5 minutes) ; **canaux 4 et 5** : chromatine native digérée (1 et 5 minutes) ; **colonne 6** : taille des molécules, en nombre de paires de nucléotides (ou « bases »).




**1.** Quelles conclusions tirez-vous des expériences de digestion de l'ADN nu ?
**2.** Même question pour la digestion de la chromatine.
Lorsque la digestion est poursuivie, dans les deux expériences, jusqu'à 10 minutes, on observe les résultats suivants : pour l'ADN nu, on n'observe pratiquement plus d'ADN dans le canal, tandis que pour la chromatine, une seule et très grosse bande est observée à une position correspondant à une taille de 146 paires de nucléotides.
**3.** Comment interprétez-vous l'ensemble de ces résultats ?

## Solution

**1.** L'ADN « nu » non digéré ne migre presque pas dans le gel car sa **masse moléculaire** (sa taille) **est très élevée** ; ceci montre qu'il n'a pas été cassé en petits fragments au cours de l'extraction, condition capitale pour la suite de l'expérience. Le même ADN

soumis à une digestion courte (1 minute) donne une longue **traînée continue de bandes** correspondant à des molécules plus petites, issues de la coupure des longues molécules de départ. Lorsque la digestion dure 5 minutes, les produits obtenus sont des molécules encore plus petites, atteignant 200 à 300 paires de bases ; l'action de l'enzyme étant plus longue, l'ADN est coupé en fragments plus courts.

**2.** La chromatine digérée donne des profils différents de ceux vus auparavant : des **bandes bien individualisées** apparaissent, au lieu d'une traînée continue, montrant une périodicité de l'ordre de 200 paires de bases. Dans le canal 4, l'ADN de la chromatine a été partiellement digéré, car il reste encore beaucoup de molécules de très haut poids moléculaire ; dans le canal 5, en revanche, la digestion est plus complète car toutes les grosses molécules ont disparu et ce sont les molécules les plus courtes (200, 400, 600, etc.) qui sont les plus abondantes.

Ces profils montrent que **l'ADN au sein de la chromatine est protégé**, et que l'enzyme ne peut le couper qu'en des endroits limités, apparemment toutes les 200 paires de bases seulement, en raison de la présence des bandes correspondant à des multiples de 200 dans les digestions partielles. À la fin de la digestion, on attendrait donc que toutes les molécules obtenues aient cette taille.

**3.** Lorsque la digestion est complète, tout l'ADN nu est coupé en **minuscules fragments qui sortent du gel** au cours de l'électrophorèse, en raison de leur petite taille. Pour la chromatine, la taille limite atteinte est de 146 paires de bases, et non pas 200. En fait, lorsque la digestion reste courte, l'enzyme coupe aléatoirement l'ADN entre les unités qui le protègent, d'où la périodicité observée ; quand elle est complète, on observe que la longueur d'ADN réellement protégée est de 146 paires de bases. La différence entre 200 et 146 correspond à une longueur d'ADN nu accessible à l'enzyme, et qui peut être totalement digérée si le temps est suffisant.

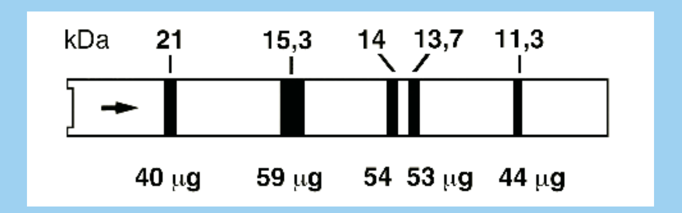
Ces expériences permettent de mettre en évidence les **nucléosomes**, répartis en moyenne toutes les 200 paires de bases d'ADN, mais qui en protègent seulement 146 de façon parfaite. On définit ainsi les notions **d'ADN nucléosomique** (protégé) et **d'ADN internucléosomique**, qui reste nu et accessible à l'enzyme utilisée.

## Organisation des nucléosomes

L'étude de l'organisation précise des nucléosomes a été réalisée à partir des particules de chromatine obtenues grâce aux expériences de digestion précédentes, et dont l'ADN possède une taille de 200 paires de bases, après leur purification. Les expériences suivantes ont été conduites :

1) l'analyse biochimique quantitative de la chromatine a montré qu'elle contient presque exactement la même masse de protéines (les histones) et d'ADN ;

2) les protéines de la chromatine ont été purifiées et soumises à une électrophorèse dénaturante en gel d'acrylamide SDS ; 5 bandes ont été obtenues, notées H1 (21 kDa), H2A et H2B (14 et 13,7 kDa), H3 (15,3 kDa) et H4 (11,3 kDa), dont les masses moléculaires sont indiquées dans la figure suivante :




3) après l'électrophorèse, les bandes de protéines sont découpées dans le gel, et les protéines resolubilisées peuvent être dosées précisément. Pour un échantillon déposé sur le gel de 250 µg, les masses obtenues pour chaque bande sont indiquées dans la figure, en face de chacune d'elles (voir la figure).
À partir de ces données, et sachant que la masse moléculaire d'une paire de nucléotides est de 660 Da, déterminer la structure protéique exacte d'un nucléosome.

## Solution

La comparaison des masses moléculaires et des masses vraies récupérées pour chaque chaîne permet de calculer leur **stœchiométrie** dans un nucléosome. Le calcul du rapport entre masse vraie (en mg) et masse moléculaire (en kDa) donne les résultats suivants ; pour H1 : 40/21 = 1,9 ; pour H3 : 59/15,3 = 3,85 ; pour H2A : 54/14 = 3,86 ; pour H2B : 53/13,7 = 3,87 ; pour H4 : 44/11,3 = 3,89.
Il ressort de ceci que pour les 4 histones les plus petites, le rapport est le même (égal à 3,87 environ) et que pour H1, ce rapport est de 1,9, soit exactement la moitié. On doit donc conclure que, dans le nucléosome, le rapport est de 2 molécules de chaque petite histone pour 1 seule molécule de H1. Afin d'obtenir le **nombre absolu de ces molécules** par particule, on peut faire un premier calcul sur la base la plus simple de deux molécules de H2A, de H2B, de H3 et de H4, et d'une de H1.
On a donc, en kDa : $21 + 2 \times 15{,}3 + 2 \times 14 + 2 \times 13{,}7 + 2 \times 11{,}3 =$ **129,6 kDa**. Cette masse de protéines est à comparer à celle de l'ADN pour un nucléosome : $200 \times 660$ Da = **132 kDa**. Cette valeur est donc très proche de celle calculée auparavant pour les protéines, avec l'hypothèse retenue. On doit donc conclure que dans chaque nucléosome il existe **8 molécules d'histones** (4 différentes, 2 à 2 identiques) **et une histone plus grosse (H1)**. On a montré que l'ADN fait presque 2 tours autour de la particule centrale (octamère), soit 146 paires de bases ; l'histone H1 solidarise les boucles d'ADN. Le diamètre d'un nucléosome (bien visible au MET) est de 11 nm.

FICHE 10

# La cytologie de la transcription ; le nucléole

## I Aspects cellulaires de la transcription

**• Définition moléculaire du processus :** ce processus universel consiste dans le recopiage en termes d'ARN (sous la forme d'une chaîne de ribonucléotides) d'une séquence donnée d'ADN (lui-même double-brin). Le matériel génétique est ainsi segmenté en unités d'information qui, en général, quittent le noyau et vont fonctionner dans le cytoplasme. La transcription nécessite les acteurs suivants :

- un brin d'ADN : un seul est utilisé dans la double hélice : **le brin** dit « **matrice** » ;
- les quatre monomères précurseurs de l'ARN : les **ribonucléotides triphosphates** ;
- une enzyme : **l'ARN polymérase**, qui catalyse la réaction de polymérisation tout en recopiant le brin matrice en un brin complémentaire (T étant remplacé par U).

Les limites du segment transcrit, appelé « **unité de transcription** », sont : en amont, le promoteur, et en aval, le terminateur, que l'ARN polymérase reconnaît.

**• Les différents produits de la transcription :** il existe 3 principaux types d'ARN impliqués dans la synthèse des protéines (la traduction ; cf. fiche 16) :

- les ARN ribosomiques (**ARNr**), trouvés dans les sous-unités des ribosomes, très abondants (80 %) et peu divers : il en existe 4 différents (notés 28S, 18S, 5,8S, 5S), chez les Eucaryotes ;
- les ARN de transfert (**ARNt**), qui ont un rôle d'adaptateur, tous de très petite taille (4S), et d'abondance moyenne (15 %) ;
- les ARN messagers (**ARNm**), qui constituent l'information codant la séquence d'acides aminés des protéines ; très divers (plusieurs milliers d'espèces différentes), ils sont très peu abondants (5 %) au total, et *a fortiori* individuellement.

**• La transcription dans le nucléole :** cette structure nucléaire est à la fois le lieu de transcription des gènes ribosomiques et le lieu d'accumulation des **sous-unités**

**ribosomiques** qui s'y élaborent à partir des ARNr 28S, 18S et 5,8S, et de protéines. Il est possible de visualiser ces processus avec diverses techniques cytologiques, telles que l'autoradiographie ou l'ombrage métallique (cf. fiche 11). Les images obtenues par cette dernière technique sont très démonstratives de l'intensité du phénomène de transcription à ce niveau : on y décrit des figures dites en « **arbres de Noël** ». Ce type d'images spectaculaires est aussi observé lorsqu'on étudie la transcription dans des chromosomes très particuliers, dits « chromosomes géants » (cf. fiche 12).

• **La transcription dans l'euchromatine :** c'est le lieu où sont transcrits les gènes de protéines ; l'état relâché du matériel génétique à ce niveau est très favorable à la fixation et à la progression des ARN polymérases le long de l'ADN. L'utilisation de **précurseurs d'ARN** (l'uridine radioactive, par exemple) dans le cadre d'expériences de pulse-chasse (cf. fiche 17) suivies de l'autoradiographie, montre très clairement que l'euchromatine est activement transcrite, mais pas l'hétérochromatine.

# II L'utilisation des radio-isotopes

Les radio-isotopes sont des éléments naturels ou artificiels qui se distinguent des éléments stables par un rapport protons/neutrons déséquilibré ; ceci conduit à une désintégration spontanée de leurs noyaux accompagnée d'émissions de particules ou de radiations : c'est la **radioactivité**. Ces éléments ($^{3}H$, $^{14}C$, $^{32}P$, $^{35}S$…) sont caractérisés par leur type d'émission, leur demi-vie (la période) et l'énergie de leurs émissions. L'activité spécifique d'un échantillon radioactif est une mesure de la richesse de l'échantillon en atomes ou en composés radioactifs.

• **La détection des radio-isotopes :** ils sont détectés grâce à des **compteurs dits « à scintillation »** (pour des échantillons chimiques purifiés) à travers la transformation des émissions produites en photons mesurables par des photomultiplicateurs, ou bien par la technique d'**autoradiographie**, qui a des applications tant en Biologie Cellulaire (cf. fiche 16) qu'en Biologie Moléculaire (cf. fiche 23). La sensibilité extrême de cette détection, très supérieure à toutes les méthodes chimiques, fait de cette technique un outil unique pour l'étude de très nombreux processus biologiques.

• **L'utilisation des radio-isotopes :** ils sont employés sous forme de molécules minérales (ions : $Na^+$, $K^+$, $NH_4^+$, $CO_2$) ou organiques (acides aminés, nucléotides, sucres…, comportant un ou plusieurs atomes de C, d'H ou de N radioactifs). Ils sont ainsi utilisés *in vitro* ou *in vivo* comme **précurseurs** des activités métaboliques analysées. Les molécules radiomarquées n'étant pas distinguées des molécules normales par les enzymes et donc par les cellules (car elles ont les mêmes propriétés chimiques), elles sont assimilées, métabolisées de la même façon et enfin intégrées (on dit aussi : incorporées) dans leur matière ; elles agissent comme des molécules « espions » facilement détectables ; on parle de « **traceurs** ».

• **Les principales utilisations physiologiques des traceurs :** on peut en décrire deux catégories : 1) analyse des échanges, des transports et des accumulations des ions ou des métabolites, sans transformation dans les cellules et les organismes, et 2) analyse des transformations biochimiques au cours du temps, sous l'action des enzymes et au sein des divers compartiments cellulaires.

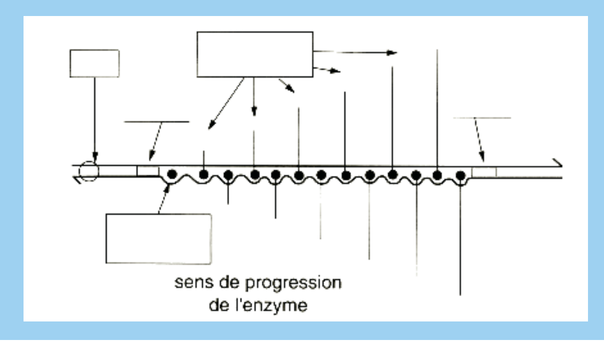
• **La fourniture des molécules radiomarquées :** les fournisseurs proposent une très grande diversité de produits utilisables par les biologistes. Ces molécules sont ajoutées aux milieux de culture des organismes ou des cellules (éventuellement injectées), ou bien incluses dans les milieux réactionnels en Biochimie ou Biologie moléculaire. Leur manipulation, compte tenu de leur toxicité à forte dose vis-à-vis de la santé humaine, et de leur rémanence, doit être extrêmement contrôlée.

## Images des complexes de transcription

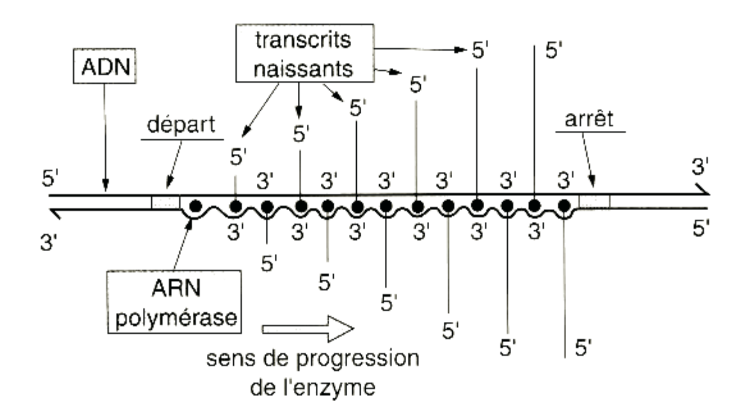
Il est possible de visualiser directement en microscopie électronique le processus de transcription à partir d'échantillons de nucléoles dissociés ou de chromatine purifiée étalés sur des supports appropriés. Les images obtenues sont toujours les suivantes : un axe d'ADN recouvert de nucléosomes, et portant des branches latérales plus ou moins nombreuses. Les clichés suivants montrent deux exemples, l'un issu d'un nucléole (1), et l'autre issu de la chromatine (2).




Légender et compléter le schéma interprétatif général proposé ci-dessous.



## Solution

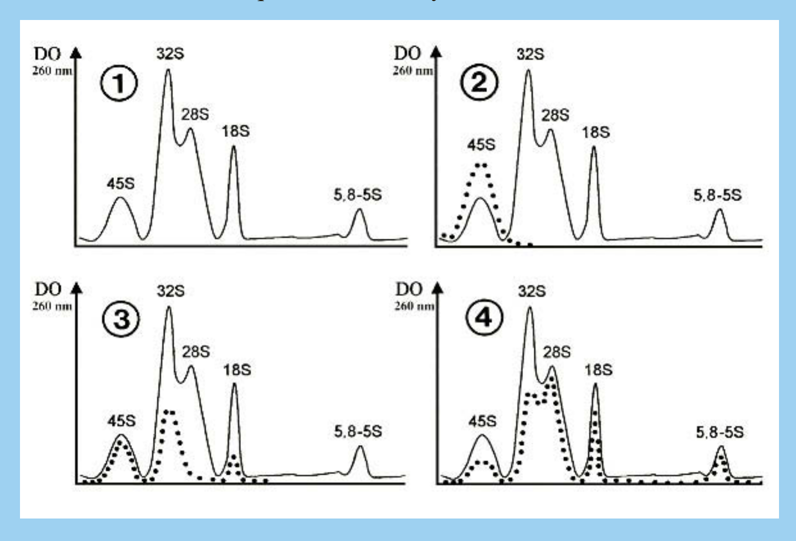



Les molécules d'ARN sont toutes identiques, mais à un stade d'autant plus avancé qu'on approche de la zone de terminaison (bien noter leur orientation, ainsi que celle des brins d'ADN) ; lorsqu'elles sont très nombreuses et denses, on parle « d'arbre de Noël ». Dans l'euchromatine, la transcription est beaucoup moins intense.

## Synthèse et maturation des ARN ribosomiques

Il est possible, à partir de fractions purifiées de noyaux de cellules animales, d'isoler des **nucléoles** puis d'en extraire les ARN spécifiques. Afin de comprendre les mécanismes de synthèse des ARN qui sont transcrits au sein du nucléole, les expériences suivantes sont conduites :
1) l'électrophorèse des ARN nucléolaires est réalisée ; la quantité d'ARN est ensuite mesurée dans le gel par enregistrement de la densité optique à 260 nm (cf. fiche 21). On obtient le profil de la fig. 1 ;
2) les cellules sont incubées dans de **l'uridine radioactive** pendant 5 minutes, les ARN nucléolaires sont extraits puis soumis à l'électrophorèse. Le gel est ensuite découpé en tranches de 1 mm, et leur radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation (courbes en pointillés). On obtient les profils de la fig. 2 ;
3) après l'incubation dans l'uridine marquée, un second lot de cellules est remis dans un **milieu normal pendant 15 minutes**, puis traité comme auparavant ; fig. 3 ;
4) un troisième lot de cellules est traité de la même façon, mais est remis dans un milieu normal pendant **60 minutes** ; la suite de l'expérience est identique ; fig. 4.

**1.** Quelle est la composition en ARN des nucléoles, en comparaison de celle des ribosomes cytoplasmiques (voir le texte) ?
**2.** Quelle molécule d'ARN est synthétisée en premier dans les nucléoles ?
**3.** Quel est le devenir de cette molécule 15 minutes après la fin de l'incubation ?
**4.** Même question pour une période de 60 minutes après la fin de l'incubation.
**5.** Que concluez-vous en ce qui concerne la synthèse des ARN nucléolaires ?




## Solution

**1.** On observe 5 populations différentes d'ARN sur le gel, parmi lesquelles trois sont **clairement identifiables comme étant les ARN ribosomiques :** ceux notés 28S, 18S, 5,8S et 5S (confondus ici) ; le nucléole semble donc être le lieu de synthèse de ces molécules. En revanche, deux molécules, notées 45S et 32S, très abondantes, y sont présentes aussi, et sans rapport apparent avec les précédentes.
**2.** Après 5 min. d'incubation dans le marqueur (« pulse »), on observe que **seule la molécule de 45S** est marquée ; elle a donc été synthétisée pendant cette période.
**3.** Après 15 min. d'incubation dans le milieu normal (« chasse »), on observe que la radioactivité de l'ARN 45S a diminué, alors que les **ARN 32S et 18S deviennent radioactifs**. On peut donc imaginer que le premier soit à l'origine des deux autres.
**4.** Le phénomène se poursuit ; les **ARN 28S et 5,8-5S sont marqués** à leur tour.
**5.** Ces expériences montrent l'existence d'une **maturation** faisant passer, par découpages et raccourcissements successifs, d'un grand précurseur 45S (le transcrit primaire des gènes ribosomiques) aux molécules d'ARN contenues dans les sous-unités ribosomiques du cytoplasme. Ce phénomène est général chez les Eucaryotes.

FICHE 11

# La cytologie de la réplication de l'ADN

## I Aspects cellulaires de la réplication ; les yeux de réplication

La reproduction des cellules est à la base de la reproduction de tous les organismes, qu'ils soient unicellulaires ou pluricellulaires. L'information génétique de chaque cellule, universellement constituée d'ADN, est contenue dans le noyau chez les Eucaryotes, ou le cytoplasme des Procaryotes. Chez les premiers, elle est dupliquée de façon conforme à chaque division cellulaire (mitose) ou bien génétiquement brassée, dans le cadre de la reproduction sexuée, lors de la méiose (cf. fiches 12 et 13).

**• Le principe de la réplication de l'ADN :** il est contenu dans la structure même de la molécule d'ADN, et basé sur la complémentarité des deux brins qui la constituent : chaque brin sert de **matrice** à la synthèse d'un brin nouveau.
De façon universelle, le **type de réplication est semi-conservatif** : quelle que soit sa longueur, la molécule d'ADN s'ouvre au niveau d'une ou plusieurs origines de réplication, et est ainsi recopiée sur chaque brin et sur toute sa longueur.

**• Les yeux de réplication :** la réplication se manifeste ainsi par la présence de ces structures, bien visibles en microscopie électronique, et qui contiennent chacune deux **fourches**, lieux de synthèse du nouvel ADN. En raison de l'activité polarisée des enzymes fabriquant l'ADN, la synthèse des deux nouveaux brins est totalement différente ; l'un se fait de façon continue et l'autre de façon discontinue, par fragments et à contre-courant du sens de progression des fourches.

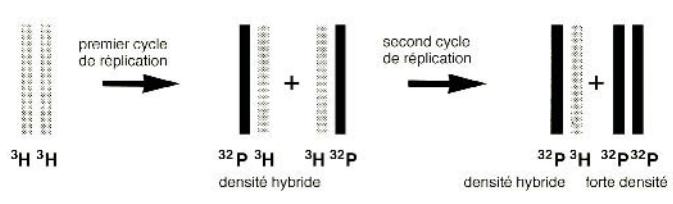
**• Les acteurs de la réplication :** en simplifiant, on décrit les faits suivants :

- le processus nécessite, outre les deux brins-matrice, un grand nombre de **protéines** et les **substrats** appropriés : les quatre désoxy-ribonucléotides triphosphates ;
- l'hélice est ouverte par une **ADN hélicase** et relâchée par une **topoisomérase** ;

– une courte **amorce d'ARN**, fabriquée par une ARN polymérase particulière, démarre tout processus de synthèse d'ADN sur le brin matrice ;
– la synthèse des brins d'ADN est assurée par diverses **ADN polymérases** ;
– la liaison entre les fragments d'ADN implique des activités **ARNase** et **ligase** ;
– des protéines spécifiques se lient aux simple-brins dégagés et les protègent.

**La réplication semi-conservative**

Le principe de cette réplication a été démontré par Meselson et Stahl, en 1958, sur l'ADN bactérien, 5 ans après la découverte de la structure en double hélice de l'ADN. Il est représenté par le schéma suivant, qui illustre l'exercice en fin de fiche :




# II Les techniques microscopiques d'analyse des formes et des surfaces

Ces techniques de microscopie électronique sont d'abord destinées à visualiser la **morphologie externe** ou la **surface d'objets** de très petites dimensions, tels que des molécules, des virus, des bactéries ou des organites isolés ; elles permettent aussi de visualiser des surfaces de fracture obtenues dans des échantillons congelés (cryofracture). Ces méthodes peuvent être mises en parallèle avec **la microscopie électronique à balayage** (cf. fiche 5), dont les performances sont équivalentes.

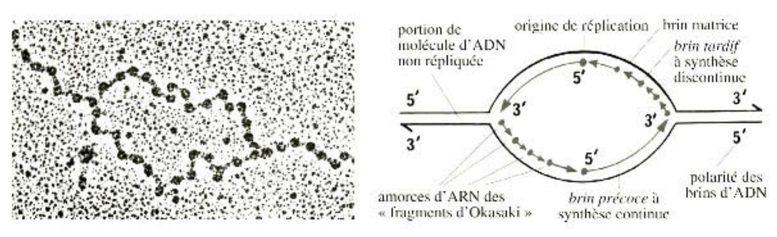
• **La coloration négative** consiste à mettre les particules à observer dans une solution aqueuse d'un composé qui, après évaporation de l'eau, ne forme pas de cristaux et est opaque aux électrons (ex : l'acide phosphotungstique). Les particules suspendues dans cette solution sont déposées sur une grille de microscopie électronique recouverte d'un fin support (film de carbone). Lors de l'évaporation de la solution, le « colorant » s'accumule autour des particules, formant un **halo opaque aux électrons** : les objets à observer apparaissent en clair sur un fond noir.
Cette méthode, rapide et très résolutive, est très appropriée pour l'observation de **virus**, de **gros complexes protéiques**, ou d'édifices tels que des microtubules ou des microfilaments ; elle permet en particulier de bien observer des **structures filamenteuses** fines que la technique des coupes ne parvient pas à visualiser.

• **L'ombrage métallique** consiste à projeter, à la surface des objets à observer, un très fin film métallique qui, selon son épaisseur locale, sera plus ou moins opaque aux élec-

trons et donnera une image « en relief » des structures. Le métal (or, platine) est porté à très haute température dans une cloche à vide, et **vaporisé sous un vide poussé**, sous un angle assez incliné par rapport au support de l'objet. Les reliefs présentés par ce dernier entraînent des dépôts plus ou moins épais de métal, qui seront alors bien visibles. C'est grâce à cette technique que des molécules telles que **l'ADN ou l'ARN**, pourtant extrêmement fines (1-2 nm), ont pu être observées.
On rappelle que l'ombrage métallique est également mis en œuvre dans les protocoles de « **cryofracture-cryodécapage** », utilisés dans l'analyse des surfaces membranaires (cf. fiche 6). La vaporisation d'une fine couche de métal sur la surface irrégulière qui a été obtenue permet d'obtenir une **réplique de la surface**, qui sera ensuite récupérée après décongélation et observée au microscope électronique.

### Les yeux de réplication vus en microscopie électronique

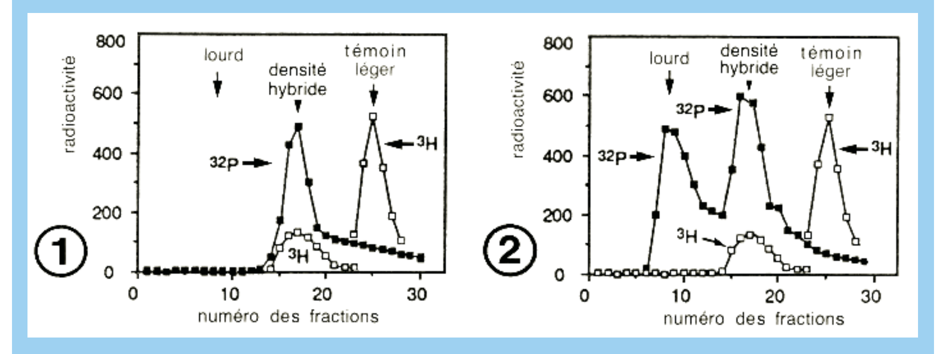
La technique d'étalement de la chromatine permet de l'observer en microscopie électronique. Au milieu de chaque œil est située une origine de réplication.




## La réplication de l'ADN

Des cellules humaines en culture sont mises en présence de thymidine radioactive ($^{3}$H-T) pendant plusieurs générations successives afin que tout leur ADN soit entièrement et uniformément marqué. Les expériences suivantes sont conduites :
1) les cellules sont soigneusement lavées afin d'éliminer toute la $^{3}$H-T du milieu ;
2) elles sont ensuite mises en présence de cytidine radioactive ($^{32}$P-C) et d'un analogue « lourd » et non radioactif de la thymidine : la bromodésoxyuridine (BrdU) ; ce dernier composé, en raison de l'atome de brome qu'il contient, alourdit significativement la molécule d'ADN, lorsqu'il y est incorporé ;
3) les cellules sont cultivées pendant un ou deux cycles cellulaires, puis leur ADN est extrait par les méthodes biochimiques ;
4) cet ADN est enfin analysé par une technique de centrifugation (en gradient de Cs Cl) qui permet de séparer les ADN selon leur densité, ce qui conduit à bien distinguer les molécules contenant 0, 1 ou 2 brins alourdis par le BrdU. À titre de témoin de densité, on ajoute dans les tubes à centrifuger une certaine quantité d'ADN « léger » marqué par la $^{3}$H-T, extrait des cellules de départ.

La distribution des molécules après la centrifugation est représentée dans les fig. 1 (un cycle cellulaire) et 2 (deux cycles) ; les ADN « légers » sont situés à droite dans les graphes, et ceux « lourds » sont situés à gauche.




**1.** Expliquer la position du pic d'ADN extrait des cellules après un cycle cellulaire et la distribution de la radioactivité $^{3}$H-T et $^{32}$P-C dans les molécules de cet ADN ;
**2.** Même question pour les deux pics observés après deux cycles cellulaires ;
**3.** À partir de ces résultats expérimentaux, quel mécanisme moléculaire proposez-vous pour la réplication de l'ADN ?

## Solution

Les trois pics obtenus dans les tubes à centrifuger représentent, de droite à gauche :

– l'ADN témoin, qui est un ADN « **léger** », avec ses deux brins normaux et « légers »,
– un ADN de densité intermédiaire (**hybride**) avec un brin « lourd » et un brin « léger »,
– un ADN « **lourd** », ayant ses deux brins alourdis par le BrdU.

**1.** Après un cycle, l'ADN cellulaire a une densité intermédiaire et est donc hybride : un brin léger, issu de la molécule parentale, et un brin lourd néosynthétisé ; ceci est confirmé par le marquage radioactif, qui est à la fois de type $^{3}$H et $^{32}$P ;
**2.** Après deux cycles, l'ADN cellulaire présente deux pics : un pic de densité intermédiaire semblable en tout point à celui vu dans la fig. 1, et un pic « lourd » marqué uniquement par le $^{32}$P. Ce dernier correspond à de l'ADN alourdi sur ses deux brins, et donc entièrement néosynthétisé.
**3.** Ces résultats peuvent se représenter schématiquement de la façon illustrée dans l'encart présenté plus haut ; ils sont tout à fait caractéristiques d'un processus de **réplication semi-conservative** de la molécule d'ADN, dont chaque brin sert de matrice pour un brin complémentaire, à chaque cycle de division des cellules.

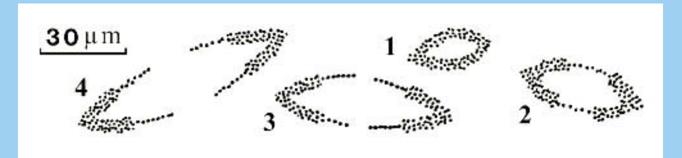
# Le fonctionnement des yeux de réplication

Des cellules humaines en culture sont mises en présence de thymidine radioactive ($^3$H-T) afin de marquer leur ADN. La détection de l'ADN radioactif est ici réalisée au moyen de l'**autoradiographie** (cf. fiche 16). Le protocole est le suivant :

– les cellules sont incubées pendant 15 min. dans une solution de $^3$H-T ayant une activité spécifique (AS) de 15 curies/mMole, puis pendant 15 minutes dans une solution de $^3$H-T ayant une AS trois fois plus élevée ;

– les cellules sont ensuite lysées de façon aussi douce que possible, de sorte que **les noyaux éclatent** sans que les molécules d'ADN soient cassées ;

– **l'ADN libéré est** ensuite soigneusement **étalé et séché** sur une lame de verre, et une autoradiographie est ensuite conduite ; on a obtenu les images suivantes :




**1.** Comment interprétez-vous ces différentes images, en tenant compte du fait que les cellules ont successivement incubé dans deux solutions d'AS différentes ?

**2.** Quelle est la **vitesse de progression d'une fourche** de réplication ?

**3.** Sachant qu'un chromosome humain « moyen » contient une molécule d'ADN de 4 cm de long et que la durée d'un cycle cellulaire est de 24 h, pensez-vous qu'une seule origine de réplication soit suffisante pour assurer la réplication de ce chromosome ? **Combien d'origines sont nécessaires** si la phase de synthèse de l'ADN dure 6 h ?

## Solution

**1.** Seuls sont visibles les segments d'**ADN radioactif synthétisé pendant les 30 min** d'incubation ; on observe des yeux de réplication fermés (1, 2) ou ouverts (3, 4). Les « yeux fermés » ont seulement fonctionné pendant les 30 min, alors que les « yeux ouverts au milieu » avaient commencé à fonctionner avant le début de l'expérience (ADN non radioactif au centre). Le **sens de progression** de la synthèse est donné par l'épaisseur du trait, le nombre de grains d'argent étant fonction de l'AS de l'$^3$H-T.

**2.** Une fourche de réplication produit 30 µm d'ADN en 30 min, soit **60 µm/h**. Un œil de réplication, qui fonctionne de **façon bidirectionnelle**, en produit 120 µm/h.

**3.** Un chromosome moyen contient un ADN long de $4 \times 10^4$ µm. Une seule origine de réplication située au milieu permet de répliquer ce chromosome en : $4 \times 10^4/120 = 333$ heures ! Ceci n'est pas compatible avec la durée d'un cycle cellulaire de 24 h. Pour effectuer la synthèse en 6 h, il faudra au minimum 333/6 = **55 origines**.

FICHE 12

# Les chromosomes ; les divisions cellulaires

## I La mitose et la méiose

Il existe chez les Eucaryotes deux types de division cellulaire, l'un associé à la reproduction conforme du matériel génétique : la mitose, et l'autre impliqué dans le brassage génétique lié à la reproduction sexuée : la méiose. Dans les deux cas, le noyau interphasique disparaît et la chromatine est profondément remaniée de façon à permettre le partage de l'information génétique en deux (ou quatre) lots répartis dans les cellules filles résultant de la division du cytoplasme.

• **Les chromosomes** apparaissent sous la forme de fins filaments au sein du noyau, lorsque la cellule entre en division. Ils s'épaississent et se raccourcissent progressivement tout au long d'un stade appelé **prophase**. Leur condensation et leur visibilité sont maximales au stade nommé **prométaphase** ; ils apparaissent alors sous la forme de bâtonnets plus ou moins longs porteurs d'un rétrécissement appelé **centromère**, séparant deux bras terminés par des télomères.

• **La mitose** est précédée par la duplication du matériel génétique, qui implique la réplication de l'ADN (cf. fiche 11). Lors de la prophase, des chromatides sœurs strictement identiques, et accolées l'une à l'autre, s'individualisent ; elles resteront associées jusqu'à la fin de la **métaphase**, qui voit les chromosomes « clivés » en deux chromatides se disposer sur le **plan équatorial**. L'**anaphase** débute par la séparation de ces chromatides et leur migration vers les deux pôles opposés de la cellule.
Après la séparation du matériel génétique, la **cytodiérèse** partage le cytoplasme en deux parties généralement égales (cf. fiche 13) et donne deux cellules-filles.

• **La méiose** est une succession de deux divisions se réalisant nécessairement sur une **cellule diploïde** (2*n* chromosomes) ; elle conduit à **quatre cellules haploïdes**, génétiquement différentes entre elles, et héritant d'un seul stock chromosomique (n). Elle constitue un mécanisme générateur de diversité, grâce à deux types différents de brassage de l'information génétique : le **brassage inter-chromosomique**, basé sur un phénomène aléatoire de répartition des chromosomes homologues lors de la métaphase 1, et le **brassage intra-chromosomique**, qui met en jeu des échanges entre chromatides

de chromosomes homologues (crossing-over), lors de la prophase 1. Le résultat global de ces événements constitue la **recombinaison génétique**.

# II La détection d'ADN et d'ARN spécifiques par hybridation *in situ*

Ces méthodes sont basées sur la propriété bien connue que possèdent les acides nucléiques de pouvoir constituer des hybrides double-brin stables, sur la base de la **complémentarité des bases** G et C, et A et T (ou U pour l'ARN). La molécule d'ADN, après **dénaturation** (séparation des deux brins) par la chaleur, par exemple, est capable de se renaturer (reconstituer sa structure en double brin) dans certaines conditions expérimentales ; il en est de même pour un simple brin d'ADN et un brin complémentaire d'ARN, ou bien deux brins complémentaires d'ARN. On parle « **d'hybridation** » entre brins complémentaires initialement séparés, lorsque ceux-ci sont expérimentalement mis en présence et se réapparient.

• **Le principe de la méthode :** de même que l'immunocytochimie permet de localiser des protéines sur un support ou au sein des structures cellulaires, l'hybridation permet de repérer des séquences particulières d'ADN ou d'ARN, grâce à des « **sondes nucléiques » simple-brin** connues, qui sont l'équivalent des anticorps. La détection se fait aussi bien sur des structures cellulaires présentes dans des coupes ou des écrasements de cellules, en Biologie Cellulaire que sur des « filtres » résultant du transfert des gels d'électrophorèse, en Biologie Moléculaire (cf. fiche 23).

• **Les sondes nucléiques :** il s'agit de **fragments purifiés et connus** d'ARN ou d'ADN marqués de telle sorte que les hybrides formés avec leur cible présente sur le support puissent être aisément repérables au microscope optique ou électronique. Le **marquage des sondes** est fait *in vitro* au moyen de précurseurs radioactifs (sondes radiomarquées ; cf. fiche 10) ou bien de précurseurs auxquels des groupements antigéniques (sondes froides) ou des fluorochromes ont été greffés chimiquement (cf. fiche 8). Selon le type de marquage réalisé, les hybrides sont détectés par autoradiographie (cf. fiche 16), par immunodétection ou même par fluorescence. Lorsque des cellules sont observées (coupes ou écrasements) et que des structures contenant les acides nucléiques sont recherchées, on parle « **d'hybridation *in situ*** ». La technique récente, et très puissante, qui utilise la fluorescence est nommée en anglais : **FISH** (fluorescence *in situ* hybridization).

• **Les utilisations :** ces méthodes permettent de localiser des **gènes particuliers** sur les chromosomes (normaux ou géants ; voir plus loin), ou de mettre en évidence des **ARN spécifiques** dans le cytoplasme des cellules. Elles sont très utilisées en Biologie du Développement. Lorsque des molécules d'ADN sont détectées sur filtre, après électro-

phorèse, on parle de « Southern blot » ; dans le cas de l'ARN, on parle de « northern blot » (cf. fiche 23).

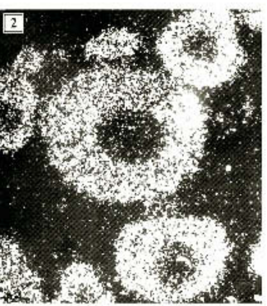
### Exemples de localisation de gènes ou d'ARN spécifiques

Les clichés suivants montrent deux exemples d'utilisation de l'hybridation *in situ* avec des sondes radiomarquées pour localiser des séquences d'ADN ou d'ARN.

– Le cliché 1 présente la détection par autoradiographie (cf. fiche 16) de **séquences de type « transposons »** dans un chromosome géant (cf. fiche 13) de larve de Drosophile ; les points noirs sont les grains d'argent marquant la présence de la sonde radioactive hybridée sur sa cible, c'est-à-dire le gène (ici en plusieurs copies).

– Le cliché 2 présente le résultat d'une expérience identique destinée à révéler des **transcrits d'un gène nommé « oncogène »**, stockés dans le cytoplasme d'ovocytes d'un Amphibien ; l'observation en « fond noir » fait ici apparaître les grains d'argent sous la forme de points blancs sur fond noir. Le noyau, lieu de transcription de l'ARN, n'est clairement pas un lieu de stockage.




## Rôles des divisions chez les Eucaryotes

Les divisions cellulaires interviennent dans de nombreux processus chez les êtres unicellulaires et les organismes multicellulaires ; les propositions suivantes illustrent cette diversité. Répondre par Vrai ou Faux.

**1.** Chez les Protistes, il existe un seul type de division cellulaire : la mitose.

**2.** Il n'existe pas, chez les Vertébrés adultes, d'organes dans lesquels se produisent régulièrement des divisions, en dehors des organes sexuels.

**3.** Les méristèmes des Végétaux supérieurs sont les seuls lieux de division cellulaire active assurant la croissance des organes.

**4.** Chez certains Animaux, on rencontre des phénomènes de prolifération localisée ou de bourgeonnement pouvant être à l'origine d'une reproduction asexuée.

**5.** Chez les Végétaux, la croissance est continue tout au long de la vie, alors que chez tous les Animaux, elle est stoppée lorsque l'âge de la reproduction est atteint.
**6.** Lorsque la différenciation cellulaire est très poussée, la capacité de division et de prolifération des cellules est généralement perdue.
**7.** Au cours du développement embryonnaire, certaines divisions cellulaires peuvent s'effectuer plus rapidement que chez les bactéries.

## Solution

**1. Faux** : bien que chez ces êtres unicellulaires, la mitose assure la multiplication des individus et l'accroissement des populations, la majorité des espèces pratique la reproduction sexuée, qui implique la méiose et l'alternance des phases 2n et n.
**2. Faux** : dans de nombreux tissus et organes, il existe un renouvellement constant des cellules par division mitotique. C'est par exemple le cas des épithéliums, des cellules sanguines, des cellules osseuses ; le taux de renouvellement est très variable.
**3. Vrai** : les méristèmes caulinaires (tige) et racinaires (racine) assurent seuls l'allongement et l'accroissement en diamètre de ces organes.
**4. Vrai** : les Métazoaires inférieurs, tels que les Spongiaires et les Cnidaires, ou bien les Cestodes et les Annélides, montrent des phénomènes de prolifération cellulaire et d'organogenèse localisés qui sont à l'origine de processus de reproduction asexuée.
**5. Faux** : chez certains Animaux, la croissance est continue toute la vie ; c'est le cas des Crustacés et des Poissons, par exemple. Les Mammifères et les Insectes, en revanche, cessent toute croissance à l'état adulte.
**6. Vrai** : de façon générale, une différenciation poussée est incompatible avec la division : il suffit de penser aux cellules musculaires et aux cellules nerveuses, qui possèdent des morphologies et des structures très élaborées empêchant la division.
**7. Vrai** : lors de la segmentation, les cellules peuvent se diviser en moins de 30 min.

## Le brassage interchromosomique chez l'Homme

Lors de la méiose d'une cellule diploïde $2n$, on obtient différentes combinaisons haploïdes des chromosomes homologues d'origine paternelle et maternelle (brassage inter-chromosomique). Le nombre N de combinaisons possibles est de :

$$N = 4, \text{ si } n = 2 \text{ ; } N = 8, \text{ si } n = 3 \text{ ; } N = 16, \text{ si } n = 4.$$

**1.** Déduire la loi mathématique simple qui prédit le nombre N en fonction de n.
**2.** Sachant que, chez l'Homme, une cellule diploïde contient 46 chromosomes, calculer le nombre théorique de combinaisons N que l'on peut obtenir, si on considère un très grand nombre de cellules sexuelles en méiose.
**3.** Quel commentaire ce résultat vous suggère-t-il ?

## Solution

**1.** Cette loi simple est la suivante : $N = 2^n$.
**2.** Chez l'Homme, n = 23 ; on a donc $N = 2^{23}$. Si on admet que $2^{10}$ = environ $10^3$ (1024), on a : $2^3 \times 2^{10} \times 2^{10}$ = environ $8 \times 10^3 \times 10^3$ = 8 millions de combinaisons !
**3.** La production effective des ovules, dans la vie d'une femme, étant très réduite (en simplifiant, on calcule moins de 600 ovules pondus), on conclut que toutes les possibilités génétiques ne sont pas « explorées », dans ces conditions. Ceci d'autant plus qu'il faut ajouter à ce brassage aléatoire celui lié aux crossing over, qui augmente considérablement le nombre potentiel de combinaisons génétiques.

## Organisation des chromosomes

L'ADN est extrêmement compacté au sein des chromosomes métaphasiques, de façon à faciliter mécaniquement la distribution du matériel génétique lors de la division. Divers niveaux d'organisation ont été mis en évidence, dont l'efficacité de compaction est évaluée par les calculs suivants.
Un chromosome humain « moyen » contient une molécule d'ADN de 4 cm de long. En métaphase, la longueur d'une chromatide « moyenne » est de 4 µm environ, et son épaisseur est de 0,7 µm ; la microscopie électronique montre que la structure de base de son organisation est la fibre de 30 nm (cf. fiche 9).
**1.** Quel est le degré de compaction de l'ADN nu dans une chromatide ?
**2.** Sachant que, dans la fibre nucléosomique serrée, un nucléosome fait passer une longueur d'ADN nu d'environ 200 paires de bases (10 paires de bases = 3,4 nm) à une bille de 11 nm de diamètre, quel degré de compaction est ainsi obtenu ?
**3.** Dans la fibre de 30 nm, on compte 6 nucléosomes par tour de solénoïde, chacun d'eux pouvant être représenté par un disque d'épaisseur de 11 nm. Si on admet que ces disques sont bien jointifs, quelle compaction est obtenue grâce à cette structure ?
**4.** Quels niveaux d'organisation supérieurs doit-on invoquer pour pouvoir construire une chromatide condensée ?

## Solution

**1.** Le facteur final de compaction est de : $40 \times 10^3$ µm/4 µm = $\mathbf{10^4}$.
**2.** On calcule que 200 paires de bases correspondent à 68 nm ; un nucléosome de 11 nm permet donc de compacter l'ADN d'un facteur égal à 68/11 = **6,18**.
**3.** Avec 6 nucléosomes par tour, pour une même épaisseur de 11 nm, le facteur de compaction devient : $6 \times 6{,}18$ = **37,1**. On est donc très loin du facteur $10^4$.
**4.** La fibre de 30 nm doit être compactée, de façon à être encore raccourcie. Dans un premier temps, elle forme des **boucles de 300 nm d'envergure**, pontées à leur base par diverses protéines ; dans un second temps, cette structure est organisée en une super-hélice permettant d'atteindre les dimensions d'une chromatide. On considère qu'il existe ainsi plusieurs centaines ou milliers de boucles dans chaque chromatide.

FICHE 13

# L'appareil mitotique ; la cytodiérèse

## I Aspects dynamiques de la division

La division est une phase dynamique très spectaculaire dans la vie des cellules. Les **chromosomes** apparus au cours de la prophase sont distribués en deux lots dans les deux cellules filles, dont le cytoplasme provient du partage en deux parts, le plus souvent égales, du cytoplasme de la cellule-mère : la **cytodiérèse**. On décrit donc deux types de mouvements, assurés par des éléments différents du cytosquelette : les **microtubules** pour les chromosomes, et les **microfilaments** pour la cytodiérèse.

• **L'appareil « mitotique » des cellules animales** (décrit aussi lors de la méiose !) est constitué de trois types de microtubules émanant des deux centrosomes situés aux deux pôles de la cellule en division (cf. fiche 8). Les microtubules **astériens** sont situés vers l'extérieur, par rapport au noyau, et ils sont ancrés dans la membrane plasmique. Le fuseau mitotique est formé de deux types de microtubules : ceux dits **kinétochoriens**, qui capturent les chromosomes par leur extrémité + et participent à leur mouvement centrifuge lors de l'anaphase, et ceux dits **polaires**, qui forment une sorte d'armature rigide dans la zone centrale de la cellule, facilitant la séparation.

• **La cytodiérèse chez les cellules animales** se réalise grâce à un pincement du cytoplasme au niveau du plan équatorial de la cellule. Un **anneau contractile** formé d'actine associée à de la myosine assure la déformation et la constriction du cortex, comme le ferait un minuscule « muscle circulaire ». La croissance des microtubules polaires du fuseau et leur glissement relatif, assuré par des **moteurs moléculaires** (cf. fiche 8), permettent l'allongement de la cellule lors de l'anaphase.
Dans certaines cellules, la cytodiérèse n'a pas lieu après séparation des chromatides, ce qui conduit à la formation de **cellules plurinucléées** (cellules hépatiques, par exemple) ou à l'apparition de **chromosomes géants** (phénomène d'endoréplication).

• **Les spécificités des Végétaux supérieurs** (Angiospermes et Gymnospermes) : les cellules de ces organismes sont **dépourvues de centrosomes** et ne possèdent donc pas de centre organisateur de microtubules différencié. Elles ne possèdent pas d'asters et leurs microtubules forment, lors de la prophase, un **anneau** situé dans le plan équatorial.

En raison de la paroi rigide qui les entoure (cf. fiche 2), la séparation du cytoplasme met en jeu une structure originale appelée **phragmoplaste** ; celui-ci évolue en une « **plaque cellulaire** » d'origine golgienne qui est directement à l'origine de la première paroi séparant les cellules-filles.

## II Le microscope confocal ; le microscope à déconvolution

Ces techniques relativement récentes de microscopie en fluorescence (années 1980) représentent une avancée considérable par rapport au microscope à épifluorescence classique (cf. fiche 8). Elles sont particulièrement adaptées à l'observation d'objets épais, tels que des cellules entières et de grande taille, voire des fragments de tissus.

• **Principe de la microscopie confocale :** dans un microscope à épifluorescence conventionnel, la lumière excitatrice traverse l'objet et tous les plans illuminés contribuent à la formation de l'image finale, en plus de celle du plan particulier sur lequel la mise au point est faite. Les images se superposent, interfèrent les unes avec les autres, ce qui contribue à un **brouillage important de l'image attendue**, en particulier lorsque les objets ont une épaisseur supérieure à 5-10 µm. Le microscope confocal réalise en revanche une **coupe optique très fine** et parfaite de l'objet, et il permet d'obtenir successivement toutes les coupes optiques possibles dans cet objet. Les images qu'il fournit sont d'une netteté et d'une esthétique exceptionnelles.

• **Le microscope confocal** nécessite un dispositif d'éclairage utilisant un faisceau laser très fin et focalisé sur un seul point de l'objet. Ce dernier traverse l'objectif et balaie très rapidement la préparation microscopique, d'abord dans le plan horizontal, puis dans le sens vertical (épaisseur de l'objet), par plans successifs distants de 0,1 à 1 µm. L'image du point illuminé se forme au niveau d'un **photomultiplicateur** très sensible, après que la lumière ait traversé **un minuscule orifice**, de sorte que seule celle émise ou réémise par ce point unique soit captée ; tout point situé au dessus ou au dessous ne participe donc pas à la formation de l'image.
Les images obtenues sont nécessairement traitées de façon électronique et observées sur un écran d'ordinateur. Ce dernier permet aussi de reconstituer le volume observé dans l'espace, de faire tourner l'objet sur lui-même, d'en réaliser des coupes dans l'axe vertical, de projeter les coupes d'une structure donnée sur un seul plan, etc.

• **Le microscope à déconvolution** permet de réaliser des coupes optiques dans des objets épais, mais son principe est très différent. Ici, la lumière diffusée par un point lumineux est collectée dans les plans de focalisation supérieurs ou inférieurs, puis calculée, et réassignée automatiquement (et instantanément) à ce point particulier. Des programmes informatiques très élaborés, manipulant une somme énorme de données

mathématiques sont nécessaires pour obtenir ces images « idéales ». Ce dispositif est supérieur au microscope confocal, car il permet d'observer des sources lumineuses de très faibles intensités, et ce dans des cellules vivantes.

### Les chromosomes géants polyténiques

Ces chromosomes très particuliers se rencontrent dans les cellules des larves de certains Insectes et chez divers Protistes. Ils sont visibles au sein de noyaux interphasiques et n'interviennent pas dans la division. Leur caractéristique principale est leur taille anormalement grande (10 µm de diamètre et jusqu'à 500 µm de long) ; ils possèdent aussi une striation transversale très typique, après coloration. Le cliché suivant montre un tel chromosome chez une larve de *Chironomus*.



L'organisation de ces chromosomes, qui explique leur gigantisme, est la suivante :

ils sont constitués de **plusieurs centaines de chromatides** identiques, accolées sur toute leur longueur, résultant de processus de réplications successives de l'ADN sans cytodiérèse et séparation dans des cellules filles ; on parle d'endoréplications ;

les **chromatides sont très peu condensées** ; les zones où l'ADN est localement compacté sont toutes les mêmes sur les diverses chromatides (chromomères), d'où la striation vue après coloration, qui est directement liée à la concentration en ADN.

## Cytodiérèse et surface de membrane plasmique

La division d'une cellule s'accompagne évidemment de l'augmentation de la surface totale de la membrane plasmique dans les deux cellules-filles. Une question majeure liée à la cytodiérèse est donc celle de l'origine des constituants de cette nouvelle membrane. Quelques calculs simples permettent de prendre la mesure de cet accroissement rapide de surface et d'évaluer les besoins cellulaires.

Les cellules animales en culture, dont la forme est assez géométrique, sont très appropriées pour ce genre de calcul : aplaties sur leur support, et presque discoïdales en interphase, elles deviennent bien rondes lors de la division cellulaire. Cette modification de forme se fait à volume constant et s'accompagne à elle seule d'un changement de surface membranaire. Les deux cellules filles sont de taille identique.
Les données (avec des hypothèses simplificatrices) sont les suivantes :
– une cellule normale est un disque de 4 µm de haut et de 20 µm de diamètre ;
– une cellule en division, ainsi que ses deux cellules filles, sont des sphères ;
– surface d'un cercle = $\pi r^2$ ; circonférence d'un cercle = $2\pi r$ ;
– volume d'une sphère = $4/3\ \pi r^3$ ; surface d'une sphère = $4\pi r^2$.
Quels commentaires vous suggèrent les résultats de ces calculs, et quelles solutions la cellule en division peut-elle trouver à ces problèmes biologiques ?

## Solution

**1.** Si on considère que le **volume de cytoplasme** ne varie pas lors de la division, on doit donc tout d'abord le calculer à partir des dimensions de la cellule initiale :

$$V = \pi r^2 \times h \ ; \ V = 3{,}14 \times 10^2 \times 4 = 1\ 256\ \mu m^3.$$

**2.** La **surface membranaire S1** de cette cellule est celle **d'un disque** de mêmes dimensions, à savoir celle de deux cercles, plus la surface latérale :

$$S1 = 2 \times \pi r^2 + 2\pi r \times h = 2\pi r\ (r + h) = 2 \times 3{,}14 \times 10 \times 14 = 879\ \mu m^2$$

**3.** Le **diamètre de la cellule sphérique** en division est calculé de la façon suivante :

$$V = 4/3\ \pi r^3 \ ; \ 1256 = 4/3 \times 3{,}14 \times r^3 \ ; \text{ d'où on tire } r^3 = 300,\ r = 6{,}7 \text{ et } D = 13{,}4\ \mu m$$

**4. La surface S2 de cette cellule sphérique** est donnée par :

$$S2 = 4\pi r^2, \text{ avec } r = 6{,}7\ \mu m \ ; \ S2 = 4 \times 3{,}14 \times 6{,}7^2 = 563{,}8\ \mu m^2$$

**5.** Le **volume de chaque cellule fille** est la moitié de celui de la cellule initiale (pas de synthèse protéique en mitose), et est donc de 628 $\mu m^3$ ; le **rayon r' de chaque cellule fille** est calculé comme dans la réponse 3, et est donc de :

$$628 = 4/3 \times 3{,}14 \times r'^3, \text{ d'où on tire } r'^3 = 150 \text{ et } r' = 5{,}31\ \mu m.$$

**6.** La **surface S3 de chaque cellule fille** est donnée par :

$$S3 = 4\pi r'^2, \text{ avec } r' = 5{,}31\ \mu m \ ; \ S3 = 4 \times 3{,}14 \times 5{,}31^2 = 354{,}1\ \mu m^2.$$

La surface membranaire des **deux cellules filles** est donc de 708,2 $\mu m^2$.

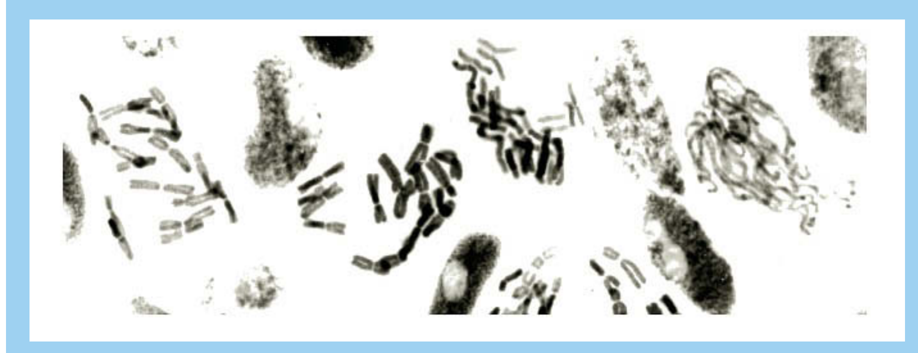
**7.** On a donc trois valeurs de surface, pour la cellule aplatie, la cellule sphérique et les deux cellules sphériques issues de la division, à savoir : **879, 564 et 708 µm².**

Lorsque la cellule s'arrondit pendant la mitose, la surface de sa membrane diminue de **35,8 %** (on sait que la sphère a le rapport S/V le plus faible de tous les volumes). Le gain de surface, quand on passe d'une cellule sphérique à deux, est de **25,5 %** seulement. Ces données suggèrent que la question de la surface de la membrane plasmique, qui change rapidement et dans les deux sens pendant la mitose, n'est sans doute pas réglée par des phénomènes de **dégradation ou de synthèse** de ses constituants. De plus,

sachant que cette membrane ne représente que quelques % du vaste réseau endomembranaire de la cellule, l'hypothèse la plus vraisemblable est que les changements rapides de la surface cellulaire sont réglés par des phénomènes d'**endocytose**, de **stockage** de vésicules dans le cytoplasme et d'**exocytose**.

## Les poisons de l'appareil mitotique

Diverses substances tirées de plantes sont connues pour perturber la division cellulaire ; une des plus anciennement connues est la colchicine (cf. fiche 8).
Des racines vivantes de bulbes d'oignon sont mises en présence d'une solution de colchicine à 0,1 % pendant 12 heures, puis elles sont fixées et l'apex est coloré pour mettre en évidence les noyaux et les chromosomes. On obtient le cliché suivant :



**1.** Pour quelle raison choisit-on de colorer l'apex des racines pour cette étude ?
**2.** Quelle technique de coloration peut-on utiliser pour colorer les noyaux ?
**3.** Quelle image attendez-vous d'une expérience identique, mais sans colchicine ?
**4.** Comment interprétez-vous ces images atypiques obtenues avec la colchicine ?
**5.** Quelle application biomédicale a été développée à partir de ces observations ?

## Solution

**1.** C'est là que se situe le **méristème**, zone de **prolifération** cellulaire intense.
**2.** On utilise la réaction de **Feulgen**, le carmin acétique ou un « colorant » fluorescent.
**3.** On devrait observer des noyaux interphasiques et des figures typiques de division.
**4.** Les chromosomes apparaissent **bien étalés**, dissociés en chromatides ou pas, mais jamais disposés selon les images connues. Ceci tient au fait que les microtubules du fuseau ont disparu à cause de la colchicine, et la division est bloquée à divers stades.
**5.** La colchicine, qui entraîne simultanément un bon **étalement** des chromosomes et un **blocage des cellules** en division, est couramment utilisée pour réaliser des **caryotypes** humains.

FICHE 14

# Le cycle cellulaire et son contrôle

## I Les cellules parcourent un cycle étroitement contrôlé

La vie de toutes les cellules est ponctuée de phases de croissance séparées par des phases de division. Ceci définit un cycle, nommé cycle cellulaire, bien que ce soit en fait une succession de cellules qui en traverse les différents stades ; il existe une très grande diversité de situations, au sein des organismes, concernant sa durée.

• **Les phases du cycle :** deux grandes périodes doivent d'abord y être distinguées : **l'interphase**, pendant laquelle le noyau a son aspect classique, et la **division**, lorsque la cellule donne naissance à deux cellules-filles, caractérisée, entre autres, par l'apparition des chromosomes et de la machinerie permettant de les séparer.
La mesure de la **quantité d'ADN nucléaire** au cours de la vie d'une cellule montre que ce dernier est synthétisé pendant une période restreinte de l'interphase : la phase S ; les phases encadrant cette dernière sont nommées G1 (après la division) et G2 (avant la division). La quantité d'ADN nucléaire en G2 est double de celle en G1.

• **Les différents types de cycles :** au sein d'un organisme complexe, animal ou végétal, très peu de cellules parcourent un véritable cycle ; en fait, seules celles qui se multiplient normalement en permanence, comme les cellules souches (sanguines, épithéliales ou sexuelles) peuvent être reconnues comme subissant un cycle.
La grande majorité des cellules ne se divise pas du tout, ou bien très lentement (une fois par an pour le foie, environ) ; les cellules tumorales sont une exception tragique à cette règle. Les cellules animales en culture, qui se divisent normalement toutes les 24 h, peuvent être qualifiées de « proliférantes », et elles constituent évidemment un modèle privilégié pour les études sur le cycle.

• **Le contrôle des étapes du cycle :** le cycle cellulaire est une séquence ordonnée d'étapes qui ne peuvent se mettre en route que si les précédentes se sont déroulées correctement. Il existe plusieurs points de contrôle, qui permettent aux cellules de vérifier à la fois si l'environnement est propice à la division, et si certains paramètres internes

sont corrects : taille de la cellule en G1, réplication correcte de l'ADN en S et G2, positionnement des chromosomes en métaphase.
Il a été montré que le cœur de ce contrôle est un complexe protéique formé d'une **kinase** (une protéine qui en phosphoryle d'autres) et une protéine à évolution cyclique, qui l'active, **la cycline.** Plusieurs de ces complexes kinase/cycline se succèdent au cours du temps, qui enclenchent des cascades de réactions de phosphorylations, dont le résultat est le passage d'une étape du cycle à la suivante.

# II Les cultures de cellules animales

La Biologie Cellulaire analyse, autant que possible, les processus cellulaires dans des systèmes simplifiés, contrôlés et *in vitro.* Les cultures de cellules animales sont un outil très important en recherche fondamentale ; leur développement, basé sur la mise au point de milieux de culture appropriés, a débuté en 1907 (Alexis Carrel).

**• Les milieux de culture :** les milieux initiaux étaient des mélanges complexes et non définis, formés d'extraits biologiques : sérum, plasma ou extraits d'embryons. Le **milieu artificiel** élaboré en 1955 (et encore utilisé de nos jours) comprend des acides aminés, du glucose, des vitamines, des antibiotiques ainsi qu'un faible pourcentage (1-5 %) de sérum fœtal de veau ou de cheval. On sait maintenant que ce dernier composant apporte, bien qu'en très faible quantité, des protéines appelées « facteurs de croissance », nécessaires à une multiplication continue des cellules.

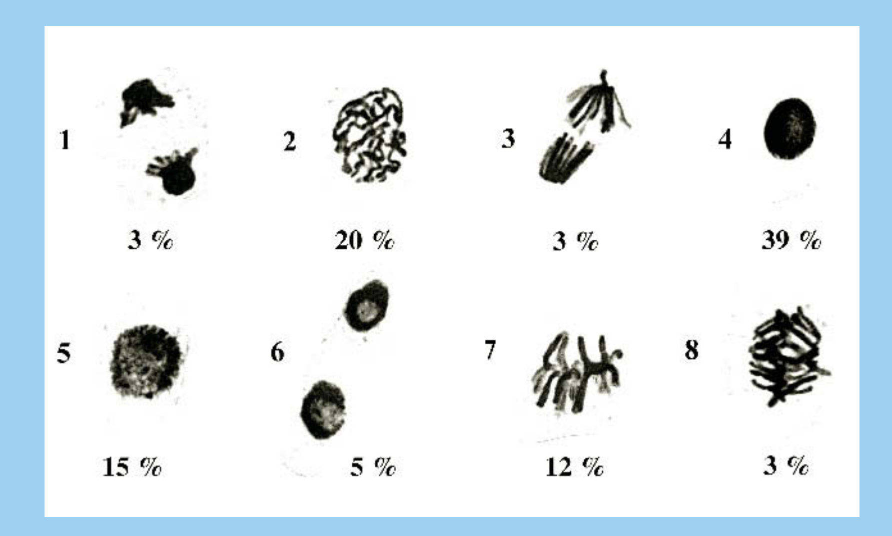
**• Les différents types de cultures cellulaires :** on obtient des **cultures primaires** directement à partir des tissus d'un organisme, désagrégés et mis en présence d'un milieu nutritif ; les tissus embryonnaires sont ceux qui se prêtent le mieux à ce type de mise en culture. Les cellules ensemencées se multiplient au fond des boîtes de Petri, et enfin le recouvrent entièrement. On peut récupérer ces cellules et, après dilution, ensemencer plusieurs nouvelles boîtes : on parle de **cultures secondaires**.
Cette opération peut être répétée un grand nombre de fois, mais on observe en général que l'on ne peut pas dépasser l'équivalent de 50 à 100 générations à partir de la culture primaire ; après ce cap, les cellules cessent de se diviser et meurent. Il existe des cultures capables de multiplier indéfiniment ; elles ont été obtenues à partir de tumeurs cancéreuses : on parle alors de **lignées cellulaires immortalisées**.
On obtient aussi de telles lignées dans des cultures secondaires normales, à partir de cellules ayant survécu après la mort de l'ensemble de la population. Ces cellules sont en fait **génétiquement anormales**, comme d'ailleurs celles des lignées tumorales.

**• Les avantages des cultures de cellules :** 1) on obtient à volonté des populations homogènes de cellules en grande quantité, 2) les cellules en culture peuvent être congelées (azote liquide), stockées et utilisées selon les besoins, 3) une très grande diversité

de types cellulaires plus ou moins différenciés sont disponibles pour les chercheurs, 4) la plupart des problèmes de Biologie Cellulaire peuvent être étudiés sur ce matériel, y compris maintenant ceux concernant la différenciation cellulaire, que l'on peut déclencher *in vitro* au moyen de diverses drogues, facteurs de croissance ou hormones. Leur inconvénient majeur est qu'elles sont très onéreuses et qu'elles nécessitent un appareillage sophistiqué et un savoir faire très élaboré.

## Durées des phases du cycle cellulaire et de la mitose

Une étude du cycle cellulaire est conduite sur une population de cellules végétales en prolifération : le méristème apical des racines de bulbe d'oignon. Ce territoire très localisé peut être disséqué, fixé, écrasé et coloré de façon à visualiser les noyaux et les chromosomes (cf. fiche 13). Voici quelques clichés représentatifs des divers types de cellules rencontrées, ainsi que leurs pourcentages dans la population.




**1.** Identifiez et ordonnez les 8 stades observés.
**2.** Pensez-vous que cette population de cellules méristématiques puisse être considérée comme synchrone, ou non synchrone ?
**3.** Comment utilisez-vous les valeurs numériques fournies pour évaluer la durée des différents stades identifiables au cours du cycle cellulaire et de la mitose ?
**4.** Sachant que la durée du cycle dans ces cellules est de 25 h, calculez les valeurs absolues de ces différentes phases. Quels commentaires peut-on faire ?

## Solution

**1.** Cliché 1 : début de **télophase** ; cliché 2 : **prophase** ; cliché 3 : fin d'**anaphase** ; cliché 4 : **interphase** ; cliché 5 : début de **prophase** ; cliché 6 : fin de **télophase** ; cliché 7 : **métaphase** ; cliché 8 : début **d'anaphase**.
L'ordre chronologique est le suivant : 4, 5 puis 2, 7, 8 puis 3, 1 puis 6.
**2.** Dans une population synchrone, toutes les cellules sont au même stade. Au sein d'un méristème, toutes les cellules sont clairement à un stade quelconque du cycle cellulaire, de façon aléatoire ; dans ce cas, on parle de **population non synchrone**.
**3.** On part du **principe statistique connu** que, dans une population parfaitement non synchrone, le % de chaque stade observé reflète le % de la durée de la phase correspondante dans le cycle complet. Ceci permet donc d'évaluer directement les durées relatives de l'interphase et de la division, d'une part, et des différents stades de la mitose, entre elles ou dans le cycle complet.
Les durées des différentes phases sont donc les suivantes : interphase = **39 %** ; prophase = **35 %** ; métaphase = **12 %** ; anaphase = **6 %** ; télophase = **8 %**.
**4.** Avec un cycle de 25 h, on calcule les durées suivantes : **interphase** = 0,39 × 25 = 9,75 h (9 h 45 min) ; **prophase** = 0,35 × 25 = 8,75 h (8 h 45 min) ; **métaphase** = 0,12 × 25 = 3 h ; **anaphase** : 0,06 × 25 = 1 h 30 min ; **télophase** : 0,08 × 25 = 2 h.
Ces chiffres sont bien caractéristiques d'une population de **cellules en prolifération active**, car l'interphase est très courte par rapport au cycle complet. Dans la division, la prophase est la plus longue des étapes, car elle correspond à un remaniement profond de l'organisation du matériel génétique. L'anaphase, simple phase de migration des chromatides aux pôles de la cellule, est toujours la phase la plus courte. La métaphase et la prométaphase (ici confondues) sont relativement longues car elles correspondent à un **point de contrôle** important dans le cycle.

## Le cycle des cellules animales en culture

Des cellules animales en culture (population non synchrone) sont mises en présence d'une solution de thymidine radioactive ($^3$H) pendant 2 heures ; après l'incubation, elles sont immédiatement fixées, incluses et traitées pour l'autoradiographie. Les cellules sont enfin observées et celles présentant des grains d'argent au niveau de leur noyau sont comptées : on observe 20 % de cellules marquées.
**1.** Comment mesureriez-vous le temps de génération de ces cellules en culture ?
**2.** D'après vos connaissances, quelles sont les cellules qui présenteront des grains d'argent ? Justifiez votre réponse.
**3.** Dans quelle phase de leur cycle se trouvaient, lors de l'incubation, ces cellules que l'on voit marquées ?

**4.** Quelle est la durée de cette phase, si l'on admet que le temps de doublement de la population est de 30 heures ?
**5.** Quelles observations ou expériences complémentaires proposez-vous pour déterminer la durée des phases du cycle qui n'ont pas encore été analysées ?
**6.** En quoi la cytométrie en flux (cf. fiche 27) est-elle une technique appropriée pour connaître, en une seule opération, les durées des différentes phases du cycle ?

## Solution

**1.** Le temps de génération des cellules est en fait le temps de **doublement de l'effectif** dans le milieu de culture. Quand des cellules poussent sur un support transparent (ici le fond de la boîte de Petri), il suffit d'utiliser un microscope inversé et de compter le nombre moyen de cellules par unité de surface observée : ce comptage direct permet de mesurer le temps nécessaire pour que ce nombre double.
**2.** Les cellules marquées par des grains d'argent sont celles qui ont **incorporé la thymidine radioactive** dans une de leurs macromolécules, pendant la période d'incubation. Cette molécule étant un **précurseur spécifique de l'ADN**, on la retrouvera dans le noyau cellulaire, lieu où il est synthétisé et localisé.
**3.** Ces cellules étaient nécessairement **en phase S du cycle**, seule période de l'interphase pendant laquelle la synthèse de l'ADN a lieu.
**4.** Selon le principe exposé plus haut, valable pour une population non synchrone, la durée de cette phase S est donnée par : $S = 0{,}2 \times 30 =$ **6 heures**.
**5.** On ne connaît pas les durées des phases G1, G2 et M (mitose).
La **durée de la mitose** est simple à déterminer : il suffit d'observer au microscope un grand nombre de cellules, à un moment donné, et de déterminer le **% de cellules en division**. Le calcul est ensuite le même que celui posé plus haut.
La **durée de G2** est plus difficile à mesurer : après une expérience de « pulse » avec de la thymidine radioactive (2 h, comme précédemment), on réalise une longue chasse pendant laquelle on fait plusieurs prélèvements suivis d'autoradiographie (cf. fiche 17). Le temps au bout duquel on observe les **premières figures de mitoses marquées** (des chromosomes vus avec des grains d'argent) correspond à celui nécessaire, pour des cellules ayant incorporé le précurseur marqué (en phase S tardive), pour **parcourir G2** et entrer en mitose. On mesure ainsi G2.
La **durée de G1** est obtenue par soustraction des 3 autres phases du cycle complet.
**6.** Cette technique permet de comptabiliser directement les cellules en fonction de la **quantité d'ADN contenue dans leur noyau**. On obtient ainsi des % de cellules à chaque stade du cycle (mais avec G2 et M confondus), ce qui simplifie les calculs !

FICHE 15

# Le réticulum endoplasmique

## I Un réseau membranaire complexe

La compartimentation la plus spectaculaire dans les cellules eucaryotiques est celle réalisée par un vaste réseau endomembranaire nommé réticulum endoplasmique. Il s'agit de sacs unimembranaires, très aplatis, empilés les uns sur les autres, ou bien de tubules ramifiés de forme très contournée. Seule la microscopie électronique a pu dévoiler, en 1950, l'organisation intime de ces structures qui avaient été décrites, à l'échelle de la microscopie photonique, dès la fin du XIX$^{e}$ siècle.

• **Le réticulum endoplasmique (RE) rugueux (ou granulaire) :** cet ensemble de cavités aplaties, limitées par une membrane de 5 à 6 nm d'épaisseur, est caractérisé par la présence, sur sa face externe, de granules opaques aux électrons de 20 nm de diamètre environ. Ces granules sont des **ribosomes** identiques à ceux trouvés à l'état libre dans le cytosol ; sur des coupes tangentielles aux membranes, ils apparaissent disposés en chapelets de forme arquée ou même spiralée : il s'agit des polyribosomes (**polysomes**). Ces ribosomes sont en fait en pleine activité de synthèse protéique, selon un mode qui sera décrit dans la fiche suivante.
Certaines cellules animales possèdent un réticulum rugueux extrêmement développé : il s'agit toujours de **cellules sécrétrices de protéines** ; parmi elles, on peut citer les enzymes digestives, les hormones polypeptidiques, les anticorps, les protéines des matrices extracellulaires, les protéines sériques, …

• **Le réticulum endoplasmique lisse (ou agranulaire) :** il s'agit de tubules plus ou moins contournés, dépourvus de ribosomes, et en continuité avec le réticulum précédent. Il est en général peu abondant, sauf dans les cellules spécialisées dans la synthèse des lipides, telles que celles fabriquant des hormones stéroïdiennes.

## II Les techniques de fractionnement cellulaire

Elles visent à purifier, et dans le meilleur état possible, les différents organites ou structures cellulaires, afin de conduire *in vitro* des analyses de Biochimie et de Physiologie

spécifiques. Cette approche dite « réductionniste » ne doit pas faire oublier que tous les organites, au sein de la cellule, fonctionnent de façon intégrée.

• **Le principe :** elles s'adressent à des populations homogènes de cellules (tissu hépatique, par exemple, cultures de cellules animales ou végétales ; cf. fiches 14 et 24), et comportent deux étapes principales : 1) l'homogénéisation (ou broyage), qui implique la destruction de la membrane plasmique et donne un **homogénat** (extrait acellulaire) et, 2) la séparation des organites par **centrifugations successives**.

• **L'homogénéisation** a pour objectif de conduire à la destruction des cellules sans détérioration des organites. Le milieu de broyage doit respecter des exigences ioniques, osmotiques et de pH, de façon à ce que les organites (en général des vésicules) ne subissent pas de modification chimique ou de volume. Les méthodes d'homogénéisation sont de type mécanique (pistons, mixers), physique (hautes pressions, ultrasons) ou chimique (destruction des membranes par des détergents).
En fait, chaque type cellulaire nécessite des conditions de broyage particulières, mais une constante est que cette opération doit être effectuée à basse température (0-4 degrés C), et le plus rapidement possible, pour minimiser les phénomènes de dégradations chimiques liés à la libération d'enzymes à partir d'organites détériorés.

• **La séparation des organites ou des structures cellulaires** par centrifugation est basée sur le fait qu'ils se distinguent par leur taille, leur forme et leur densité. Les variations de taille sont très importantes, puisque les noyaux peuvent atteindre 10 µm, tandis que les ribosomes ou les granules de glycogène mesurent environ 20 nm. Les formes sont sphériques, filamenteuses ou complexes (les dictyosomes golgiens, par exemple). Les densités varient de 1,6 (ribosomes) à 1,1 (mitochondries).
Ces objets ne peuvent sédimenter au fond d'un tube que s'ils sont soumis à des champs de gravitation très élevés, allant de $1\,000 \times g$ (noyaux) à $100\,000 \times g$ (ribosomes), et pendant des durées pouvant atteindre plusieurs jours. Ceci est réalisé dans des **centrifugeuses** créant, par rotation d'un rotor, des champs de gravitation centrifuge artificiels. Après cette opération, on obtient, au sein d'un tube à centrifuger, un **culot** (ou **sédiment**) et un **surnageant** contenant ce qui n'a pas sédimenté. Grâce à des centrifugations successives, de plus en plus longues et donnant des champs de gravité de plus en plus élevés, on fractionne l'homogénat initial en une série de culots et un surnageant final, chaque culot représentant un organite ou une structure donnés ; on parle alors de protocole de **centrifugation différentielle**.

## Organisation du réticulum endoplasmique (RE)

Répondez par vrai ou faux aux propositions suivantes décrivant les caractéristiques structurales des deux types de réticulum présents dans les cellules eucaryotiques.

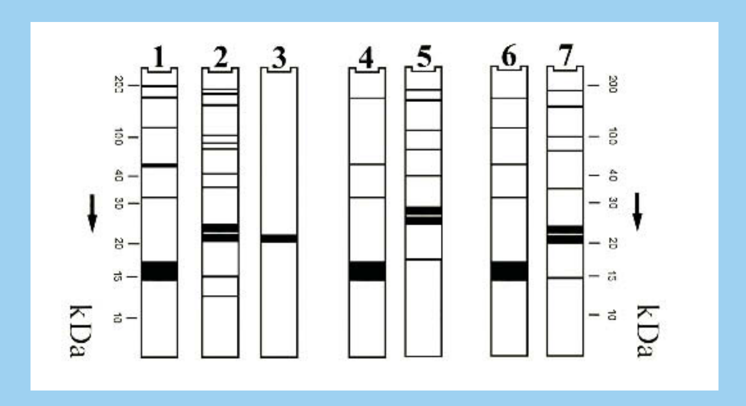
**1.** Les cavités du RE communiquent directement avec l'espace périnucléaire et avec le milieu extracellulaire.
**2.** La surface du RE peut représenter jusqu'à 60 % de la surface totale des membranes cellulaires.
**3.** Le RE lisse des cellules animales est spécialisé dans la synthèse et la sécrétion des polysaccharides.
**4.** Le RE rugueux est caractérisé par la présence, sur sa face luminale (interne), de ribosomes spécifiques, légèrement différents de ceux existant à l'état libre.
**5.** Les RE lisse et rugueux sont complètement indépendants structurellement et fonctionnellement au sein de la cellule.
**6.** La fragmentation du RE rugueux, lors d'un protocole d'homogénéisation, donne naissance à de minuscules vésicules nommées « microsomes rugueux ».
**7.** Les cellules spécialisées dans la sécrétion des hormones polypeptidiques ont un RE rugueux très développé, de même que celles sécrétant les enzymes digestives.

## Solution

**1. Faux** : il n'y a jamais d'ouverture directe sur l'extérieur, mais elles communiquent en effet avec l'espace périnucléaire, leurs membranes étant en continuité.
**2. Vrai** : cette valeur est très souvent atteinte, et parfois largement dépassée dans certaines cellules très actives en synthèse de protéines sécrétées, comme les cellules acineuses pancréatiques des Vertébrés.
**3. Faux** : le RE lisse est spécialisé dans la synthèse des lipides : phospholipides, cholestérol et hormones dérivées de ce dernier (stéroïdes).
**4. Faux** : le RE rugueux porte, sur sa face externe (cytoplasmique), des ribosomes en tous points identiques à ceux trouvés, à l'état libre, dans le cytosol.
**5. Faux** : ils sont en continuité l'un avec l'autre et échangent, grâce à la fluidité membranaire, des lipides et des protéines membranaires qu'ils synthétisent. À eux deux, ils constituent une vraie « machinerie » de fabrication de membranes.
**6. Vrai** : la pulvérisation des membranes du RE rugueux lors de l'homogénéisation conduit à la vésiculisation spontanée de minuscules lambeaux de membranes, formant des « microsomes rugueux ». Ces vésicules possèdent des ribosomes fixés sur leur face externe, et sont donc structurellement et fonctionnellement identiques au RE rugueux. Ils sont utilisés dans des expériences de synthèse *in vitro* de protéines (cf. fiche 16) pour tester le rôle du RE rugueux dans les cellules.
**7. Vrai** : les cellules sécrétant activement des protéines (animales ou végétales) sont pourvues d'un abondant RE rugueux et d'un volumineux appareil de Golgi.

# Comparaison de la synthèse de deux protéines

On compare la synthèse protéique dans deux types cellulaires structuralement très différents : les cellules de **l'antéhypophyse** et les **réticulocytes sanguins** (cellules précurseurs des hématies) ; les premières possèdent un abondant RE rugueux, tandis que les secondes sont dépourvues de tout système membranaire interne, comme les hématies. Ces cellules diffèrent également au plan de leurs synthèses protéiques ; celles de l'hypophyse fabriquent majoritairement et sécrètent deux hormones : la **prolactine et l'hormone de croissance (GH)**, tandis que les réticulocytes fabriquent à peu près exclusivement de **l'hémoglobine**.
Les **protéines totales** de ces deux types de cellules sont extraites et soumises à l'électrophorèse en présence de SDS (cf. fiche 9). Les gels obtenus et colorés sont montrés dans la figure suivante : canal 1 (réticulocytes) et canal 2 (hypophyse).




**1.** Quelles conclusions tirez-vous de l'analyse de ces gels ?
Afin de localiser l'hormone de croissance parmi les protéines majoritaires des cellules hypophysaires, on procède à une expérience **d'immunodétection** par « western blot » (cf. fiches 7 et 23) sur le gel 2. Le résultat est donné dans le canal 3.
**2.** Quelle information cette expérience vous donne-t-elle ?
Dans une deuxième série d'expériences, on extrait les **ARN messagers** (ARNm) totaux à partir des deux types de cellules étudiés. Ces ARNm sont ensuite traduits dans un extrait acellulaire permettant la **synthèse protéique *in vitro*** (cf. fiche 16) ; un acide aminé radioactif ajouté à ce système permet de repérer les seules protéines néosynthétisées grâce à **l'autoradiographie** (cf. fiche 17).

Le résultat de cette technique est présenté dans les canaux 4 (réticulocytes) et 5 (hypophyse). La détection de l'hormone de croissance dans le gel 5 par « western blot », montre que la bande abondante la plus basse réagit avec l'anticorps anti-GH.
**3.** Que montre cette expérience de synthèse *in vitro* à partir d'ARNm purifiés ?
**4.** Quelle information importante apporte la technique du « western blot » ?
Enfin, une dernière expérience de traduction *in vitro* est conduite, mais en ajoutant au milieu réactionnel une certaine quantité de **microsomes rugueux** extraits de cellules pancréatiques. Les résultats des autoradiographies obtenues pour les deux types d'ARNm sont présentées dans les canaux 6 (réticulocytes) et 7 (hypophyse).
**5.** D'après cette expérience, quel rôle peut-on attribuer aux microsomes rugueux ?

## Solution

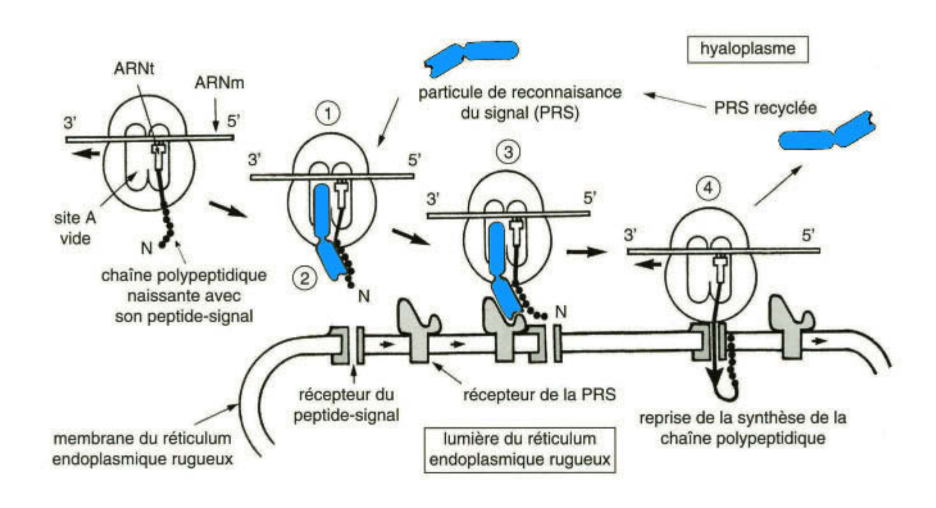
**1.** Ces gels montrent bien la présence des protéines majoritaires fabriquées par ces cellules : les **globines α et β** de l'hémoglobine, dont les masses moléculaires sont de 16 kDa environ, et les deux **hormones hypophysaires**, dont les masses moléculaires sont très voisines : environ **22 et 23 kDa** (mais on ignore l'identité des 2 bandes).
**2.** L'immunodétection sur transfert du gel 2 (« western blot ») montre que la **GH** correspond à la **bande majoritaire la plus basse**, à savoir celle à **22 kDa**.
**3.** A partir des ARNm purifiés, on fabrique *in vitro* les protéines suivantes : a) pour les réticulocytes, on obtient **une bande à 16 kDa**, identique à celle observée pour les protéines cellulaires totales ; b) pour l'hypophyse, en revanche, on obtient bien deux bandes également très proches, mais dont les masses moléculaires sont visiblement plus élevées que celles observées *in vivo* : **26 et 27 kDa** environ.
**4.** Le « western blot » montre que la protéine de 26 kDa, bien que n'ayant pas la taille de la GH normale, y est étroitement apparentée puisqu'elle réagit avec l'anticorps qui a été fabriqué contre elle. Il s'agit peut-être d'une forme plus longue, immature, de la GH : on peut donc faire l'hypothèse d'une molécule de type **« précurseur de GH ».**
**5.** L'ajout des microsomes rugueux au système de traduction « de base » a un effet très intéressant : on retrouve, avec ces structures, des tailles de protéines d'hypophyse **identiques à celles observées *in vivo***, dans les extraits protéiques bruts. Cet ajout n'a en revanche aucun effet sur la taille des globines qui reste, dans toutes les conditions expérimentales testées, invariante.
Ces observations sont à mettre en parallèle avec les données structurales présentées au début de l'énoncé : il n'existe pas de RE rugueux dans les réticulocytes, alors qu'il est très développé dans les cellules de l'hypophyse. Les microsomes rugueux sont donc bien des « échantillons » fonctionnels représentatifs du RE rugueux. La question de savoir **comment ce dernier intervient pour raccourcir *in vivo* une chaîne polypeptidique**, et surtout quelle est la **signification biologique** de ce processus, sera analysée expérimentalement en détail dans la fiche suivante.

FICHE 16

# L'adressage des protéines vers le RER

## I Des mécanismes moléculaires et cellulaires complexes

**• Le processus d'insertion cotraductionnelle :** toutes les protéines synthétisées au niveau des ribosomes du RER possèdent à leur extrémité N-terminale une séquence-signal hydrophobe longue de 30 acides aminés environ. Sur le ribosome libre qui a commencé la traduction de l'ARNm, celle-ci est reconnue par une particule cytosolique nommée PRS (ou SRP : particule de reconnaissance de la séquence-signal), qui bloque la traduction. La présence de deux types de récepteurs (l'un pour la PRS et l'autre pour le peptide-signal) dans la membrane du RER permet l'arrimage du ribosome, le relargage de la PRS et la reprise de la synthèse protéique. Le schéma suivant récapitule les principales étapes de ce processus complexe.



## II Les systèmes de traduction *in vitro*

Il s'agit d'extraits non cellulaires permettant la synthèse contrôlée de protéines *in vitro,* lorsqu'on leur fournit l'ARNm correspondant ; ils constituent donc des outils très importants en Biologie Moléculaire et Cellulaire. Les premiers systèmes de ce type ont été obtenus à partir de lysats bactériens. Ils ont permis, dans les années 1960, les premières synthèses *in vitro* de protéines à partir d'ARN viraux se comportant comme ARNm (génomes d'ARN dits positifs : cf. fiche 30) et ils ont surtout permis de déchiffrer très rapidement le **code génétique** universel.

**• La composition d'un système de traduction *in vitro* :** tous les éléments nécessaires et suffisants pour qu'une protéine puisse être fabriquée à partir de son seul ARNm doivent évidemment s'y trouver : les 20 **acides aminés** protéiques, des **ribosomes**, tous les **ARNt** et les enzymes permettant de fixer leur acide aminé (**enzymes d'activation**), une source d'énergie (l'**ATP**, indispensable dans cette réaction, ainsi que du GTP), des **facteurs protéiques** d'initiation, d'élongation et de terminaison et des **ions** tels que $Mg^{2+}$. La synthèse débute dès l'instant où on introduit l'ARNm que l'on veut étudier ; afin de distinguer la protéine néosynthétisée de toutes celles qui préexistent dans le système, un ou plusieurs **acides aminés radioactifs** sont utilisés comme marqueurs (seule la protéine synthétisée est ainsi radioactive).

**• La diversité des systèmes utilisés :** trois extraits biologiques performants dérivés de types cellulaires connus pour fabriquer activement des protéines sont utilisés :

- le système dit « **lysat de réticulocyte** de lapin » est un extrait brut de ces cellules qui sont en train de synthétiser presque exclusivement de l'hémoglobine (90 %, car les ARNm des globines y sont très abondants ; cf. fiche 15). Avant toute utilisation, on doit détruire ces ARNm de globine par une ARNase diluée, afin que la synthèse attendue soit uniquement due à l'ARNm introduit ;
- le système dit « **germe de blé** » ; ce système eucaryotique est aussi très efficace pour traduire toutes sortes d'ARNm d'origine animale, végétale, de champignons, voire même de certains virus ;
- enfin, pour les ARNm bactériens et certains ARNm eucaryotiques, des **extraits bruts de *Escherichia coli*** (débarrassés de leurs ARNm endogènes, car ils en sont très riches) sont aussi utilisables ; ces systèmes sont très efficaces en raison de la relative simplicité de la machinerie de traduction procaryotique.

## Les mécanismes de la traduction

Voici quelques propositions concernant les aspects moléculaires de la synthèse des protéines ; répondez par vrai ou faux à ces propositions.

**1.** Dans la structure d'un ARNr ou d'un ARNt, il existe des régions organisées en double brin semblables à celles de l'ADN.
**2.** L'anticodon d'un ARNt se situe au niveau de son extrémité 3'OH.
**3.** Chaque ribosome contient deux sites majeurs, l'un pour la reconnaissance d'un ARNt chargé, l'autre pour la chaîne polypeptidique naissante.
**4.** Toutes les protéines eucaryotiques commencent leur synthèse par une méthionine.
**5.** Plusieurs codons peuvent servir de codon d'initiation de la traduction, tandis qu'il en existe un seul pour la terminaison.
**6.** Le décodage d'un ARNm par un ribosome débute toujours à son extrémité 3'OH.

## Solution

**1. Vrai** : ces deux ARN (molécules monocaténaires) ont une structure secondaire pourvue de nombreux segments formés de séquences complémentaires et antiparallèles, qui sont donc organisés localement en double-brins stables.
**2. Faux** : schématiquement, c'est en son milieu que se situe l'anticodon (qui est complémentaire du codon de l'ARNm, en respectant l'antiparallélisme).
**3. Vrai** : on parle de site A pour celui recevant l'ARNt et de site P pour celui dans lequel est logée la chaîne polypeptidique.
**4. Vrai** : le codon d'initiation AUG correspond à cet acide aminé ; cependant de nombreuses protéines matures sont amputées de leur partie N-terminale et ne commencent donc plus par la méthionine à l'état fonctionnel.
**5. Faux** : seul le codon AUG sert de codon d'initiation, alors que UAA, UAG et UGA sont des codons de terminaison, ou codons stop.
**6. Faux** : c'est au niveau de son extrémité 5' phosphate que démarre la traduction.

## Mécanismes moléculaires de l'adressage

Il a été montré, dans la fiche précédente, que la synthèse de certaines protéines ne se déroule pas exactement de la même façon dans des cellules dépourvues de RE rugueux et dans celles qui en possèdent beaucoup, comme le prouve l'ajout de **microsomes rugueux** à des systèmes « standard » de traduction *in vitro*. Les expériences suivantes sont destinées à préciser le mode d'action de ces derniers.
L'ARNm de l'hormone de croissance (GH, 22 kDa) a été purifié à partir des cellules de l'antéhypophyse ; il a ensuite été testé dans un **système de traduction *in vitro*** en présence d'un acide aminé radioactif, et dans des conditions variées :
– des microsomes rugueux sont ajoutés (+) ou non au système standard (cf. fiche 15),
– ces microsomes rugueux sont ajoutés au début ou à la fin de l'incubation ;
– une enzyme protéolytique est ajoutée (+) ou non en fin d'incubation ;

– un détergent doux (de type Triton × 100) est ajouté (+) ou non en même temps que l'enzyme protéolytique.
À la fin de l'incubation (15 min), une électrophorèse classique en présence de SDS est conduite et le gel est soumis à la technique autoradiographique, afin de détecter la protéine synthétisée. Les résultats sont présentés sous la forme d'un tableau qui mentionne aussi les tailles (en kDa) des protéines obtenues.

| | Exp 1 | Exp 2 | Exp 3 | Exp 4 | Exp 5 | Exp 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Microsomes mis au début de l'incubation | -- | + | -- | + | + | -- |
| Microsomes mis à la fin de l'incubation | -- | -- | -- | -- | -- | + |
| Protéase ajoutée en fin d'incubation | -- | -- | + | + | + | -- |
| Détergent doux en fin d'incubation | -- | -- | -- | -- | + | -- |
| Taille de la protéine | 26 | 22 | rien | 22 | rien | 26 |

**1.** Sur quelle caractéristique biochimique s'appuie-t-on pour purifier les ARNm eucaryotiques ?
**2.** Quelle est l'action attendue de la protéase ajoutée en fin d'incubation ?
**3.** Quel est le rôle attendu du détergent doux ajouté en fin d'incubation ?
**4.** Dans quelles conditions obtient-on la forme courte (sécrétée) de la protéine et quelle information apportent les expériences de protéolyse ?
**5.** Quel résultat prévoyez-vous pour l'expérience 6, si on ajoute de la protéase à la fin ?
**6.** Résumer les modalités de la synthèse protéique au niveau du RE rugueux.

## Solution

**1.** Ces ARNm possèdent à leur extrémité 3'OH une queue de poly A qui est utilisée pour les séparer des autres ARN au moyen d'une chromatographie d'affinité (cf. fiche 22). Si on greffe en effet des molécules de poly U ou poly T sur un support inerte poreux, celui-ci **fixera spécifiquement les ARNm**, en raison de la complémentarité de leur poly A avec le poly U ou le poly T ; tous les autres ARN non fixés peuvent être éliminés, et seuls sont gardés les ARNm.
**2.** L'ajout de la protéase conduit à la **destruction par hydrolyse** de toutes les protéines de l'extrait qui lui sont accessibles, y compris celles qui ont éventuellement été synthétisées pendant l'incubation !
**3.** La cible de tous les détergents est lipidique ; ici, seules les **membranes** des microsomes sont susceptibles d'être solubilisées par le Triton × 100. Si ce dernier détruit leur

membrane, leur contenu sera libéré et deviendra accessible à la protéase ajoutée simultanément dans le tube à essais. Ce test permet de savoir si une protéine est libre dans la solution ou bien si elle est **protégée** dans une vésicule close.

**4.** La forme courte (GH sécrétée : 22 kDa) est obtenue uniquement lorsque des **microsomes sont ajoutés au milieu** réactionnel (exp 2 et 4). Cette forme est protégée d'une protéolyse (exp 4), mais ne l'est plus en présence de détergent (exp 5), ce qui confirme qu'elle est enfermée dans les **vésicules microsomales**. En l'absence de microsomes (exp 1), ou lorsque ceux-ci sont mis à la fin de l'incubation (exp 6), on obtient la forme lourde qui est libre et dégradable par la protéase (exp 3).

**5.** Dans ce cas, la forme lourde obtenue (forme libre) sera sans doute dégradée par la protéase, et c'est bien ce que confirment les expériences.

**6.** Le schéma général que l'on peut déduire est celui du processus dit **d'insertion cotraductionelle** : les protéines fabriquées au niveau des ribosomes liés au RER sont simultanément injectées dans sa cavité, ce qui s'accompagne de leur raccourcissement, correspondant à **l'élimination de la séquence-signal** N terminale.

## La particule dite « PRS » (ou « SRP »)

On peut isoler, à partir du cytosol des cellules pancréatiques, une particule de coefficient de sédimentation de 11 S, et dont la masse moléculaire est de 336 kDa (cf. fiche 15). Cette particule purifiée permet, lorsqu'elle est ajoutée à un système de traduction *in vitro* contenant des microsomes rugueux, d'augmenter de façon considérable l'efficacité d'insertion cotraductionnelle des protéines dans le RER.

Les expériences suivantes sont conduites :

– un traitement de cette particule avec de l'ADNase n'a aucune conséquence ;

– un traitement avec de l'ARNase ou une protéase abolit l'effet sur l'insertion ;

– l'étude spectrophotométrique (cf. fiche 21) d'une solution de cette particule montre deux pics d'absorption, à 260 nm et à 280 nm ;

– une électrophorèse en gel SDS (cf. fiche 9) montre la présence de 6 polypeptides en quantités équimoléculaires, de taille : 9, 14, 19, 54, 68 et 72 kDa.

Proposez un modèle d'organisation moléculaire de cette particule. On donne : Masse Moléculaire (MM) d'un nucléotide = 330 Da.

## Solution

Les traitements avec l'ARNase et la protéase montrent que la particule PRS contient à la fois **de l'ARN et des protéines** (une particule ribonucléoprotéique), ce qui est confirmé par l'électrophorèse et par les spectres d'absorption.

La masse totale des protéines, si on admet **un seul exemplaire** de chacune d'elles, est de 236 kDa ; il ne peut pas y en avoir 2, car la MM dépasserait 336 kDa.

Le reste (100 kDa) est donc constitué d'un **ARN formé de 303 nucléotides**.

FICHE 17

# La voie de sécrétion des protéines

## I Mise en évidence historique

La présence de ribosomes libres dans le cytosol et de ribosomes liés au réticulum endoplasmique a intrigué dès le départ les Biologistes Cellulaires intéressés par la synthèse protéique. L'observation d'un réticulum endoplasmique rugueux (RER) très développé dans les cellules spécialisées dans la sécrétion de protéines, telles que les cellules pancréatiques, a conduit à des recherches approfondies sur les modalités de cette synthèse, au début des années 1960.

• **Les expériences de G. Palade :** cet auteur a utilisé comme modèle le **pancréas** de cobaye, et comme technique de détection **l'autoradiographie** en microscopie électronique, décrite dans cette fiche ; une raison majeure du choix de ces cellules est aussi leur caractère morphologiquement très polarisé, ce qui permet une analyse cytologique rigoureuse. Ces expériences représentent le prototype du protocole décrit sous le nom de « **pulse-chasse** » (cf. fiche 18), qui a pendant longtemps été le seul mis en œuvre pour étudier la physiologie cellulaire (voir l'exercice suivant).

• **L'identification de la voie de sécrétion des protéines :** la synthèse des protéines sécrétées débute au niveau du **RER**, où elles séjournent pendant un temps très bref (15-20 min.). Elles passent ensuite dans les saccules et les vésicules de **l'appareil de Golgi** (cf. fiche 18), qu'elles traversent en environ une heure ; après cela, les protéines sont accumulées et concentrées dans de grosses **vésicules de sécrétion** qui seront stockées jusqu'à l'étape finale du processus sécrétoire : **l'exocytose** (cf. fiche 5). La durée du stockage, parfois très long, est fonction du type cellulaire.

• **La généralisation des résultats :** cette voie universelle chez les Eucaryotes doit être généralisée à d'autres types de protéines, au sein des cellules. Tout d'abord, il faut noter que l'exocytose apporte, par fusion des bicouches lipidiques, des éléments de membrane qui s'ajoutent à la **membrane plasmique**, augmentant donc sa surface ; de fait, toutes les protéines intégrales de cette dernière (cf. fiche 3) ont pour origine ultime le RER. De plus, on a montré que les protéines membranaires et luminales des **lysosomes** (cf. fiche 19) sont aussi fabriquées par **insertion cotraductionnelle** au niveau du RER. La voie ainsi mise en évidence concerne donc à la fois les protéines sécrétées, les protéines de la membrane plasmique et celles des lysosomes.

# II L'autoradiographie

Cette technique est fondée sur la propriété que possèdent les composés radioactifs d'impressionner les émulsions photographiques (observation qui est à la base de leur découverte !) ; elle permet de localiser avec une grande précision une espèce moléculaire radioactive située dans un support plan.

• **Le principe de l'autoradiographie :** il suffit de déposer une émulsion vierge ou une **plaque photographique** en contact étroit avec l'échantillon plan contenant des molécules radioactives et d'attendre (de quelques minutes à plusieurs jours) qu'une image latente soit formée. Le traitement qui suit cette exposition est donc exactement le même que celui appliqué au développement des films argentiques. La présence de **grains d'argent** visibles dans l'émulsion traduit la présence de composés radioactifs situés exactement au même niveau, dans le support.

• **Les applications en Biologie Cellulaire :** l'autoradiographie s'applique à des **coupes histologiques** ou à des coupes ultrafines (en microscopie électronique), qui sont alors recouvertes d'une émulsion sensible liquide. Le problème est que la résolution de cette méthode est assez faible, dans la mesure où la taille des grains d'argent dépasse celle de nombreuses ultrastructures cellulaires.
L'apport de cette méthode a été considérable historiquement pour toutes les études de physiologie cellulaire qui étudiaient des phénomènes dynamiques, grâce au protocole décrit sous le nom de « pulse-chasse » (cf. fiche 18). Cependant, cette technique est aujourd'hui abandonnée, car largement dépassée par celle utilisant les protéines recombinées associées à la **GFP** (cf. fiche 28).

• **Les applications en Biochimie et en Biologie moléculaire :** la détection de molécules radiomarquées sur des **gels d'électrophorèse** ou des **chromatogrammes** (cf. fiches 9 et 22) se fait grâce à l'application de films photographiques posés directement sur les supports. De nombreuses expériences historiques (sur la photosynthèse, par exemple) ont été réalisées au moyen de cette méthode, et toutes les techniques de **séquençage** des acides nucléiques l'ont initialement utilisée. Actuellement, des appareils sophistiqués de détection point par point de la radioactivité tendent à la remplacer, de même que les traceurs radioactifs sont progressivement remplacés par des molécules fluorescentes.

## Protocole d'étude de la sécrétion des protéines

La fibroïne est la protéine constitutive de la soie naturelle. Cette protéine fibreuse remarquable est majoritairement fabriquée par les cellules des glandes séricigènes de la larve du ver à soie ; elle est très riche en un acide aminé, la glycine (47 % du total).

Les expériences suivantes, concernant sa synthèse, sont conduites :
– des glandes séricigènes isolées sont placées dans un milieu de survie, dans lequel elles peuvent être actives pendant au moins 2 heures ;
– ces glandes sont mises en présence de glycine radioactive ($^3H$) pendant 5 min ;
– à la fin de l'incubation (temps t0), le milieu radioactif est éliminé et les glandes sont remises dans un milieu normal mais fortement enrichi en glycine non marquée ;
– à différents temps après t0, des fragments de glandes de même masse sont prélevés et analysés en ce qui concerne leur radioactivité ; le comptage radioactif (exprimé en dpm : désintégrations par minute) est fait à la fois sur la glycine libre isolée à partir des glandes et sur celle incorporée dans leurs protéines (essentiellement la fibroïne).
Les résultats des mesures sont présentés dans le tableau suivant :

| Temps en min après t0 | glycine libre : dpm/mg de glande | glycine incorporée : dpm/mg de glande |
|---|---|---|
| 0 | 9 000 | 15 000 |
| 20 | 7 500 | 16 000 |
| 50 | 7 000 | 15 800 |
| 90 | 6 000 | 15 900 |

**1.** Discutez le choix du précurseur radioactif utilisé.
**2.** Pourquoi le second milieu (après t0) est-il enrichi en glycine non radioactive ?
**3.** Que se passe-t-il pendant la période d'incubation en milieu radioactif ?
**4.** Pourquoi la radioactivité de la glycine libre diminue-t-elle lentement après le t0 ?
**5.** En quoi les valeurs de radioactivité mesurées pour la glycine incorporée dans les protéines permettent-elles de s'assurer du bon déroulement de l'expérience ?

## Solution

**1.** La glycine étant très **sur-représentée** dans la soie, le choix de ce précurseur marqué est judicieux car cette protéine pourra être rendue **fortement radioactive** au cours de l'expérience et ainsi plus facilement détectable (et de façon spécifique).
**2.** Dans ces conditions, la glycine non radioactive **rentre très vite** dans les cellules où elle se concentre fortement et **ainsi dilue beaucoup** celle, marquée, qui était entrée pendant la période précédente. À partir du t0, la probabilité d'incorporation de la glycine $^3H$ dans les protéines devient très faible, voire **quasi nulle** ; de cette façon, on est sûr que les protéines n'ont été efficacement marquées que pendant les 5 minutes de la première phase de l'expérience (autrement dit, l'arrêt du marquage est brutal).

**3.** Pendant la période d'incubation en glycine $^3H$, **toutes les protéines synthétisées sont radiomarquées**, en particulier la soie (la plus abondante), qui sera même relativement plus marquée que toutes les autres. Après le t0, les protéines seront à nouveau fabriquées à partir d'acides aminés non marqués, en particulier la glycine.
**4.** La radioactivité de la glycine libre (celle trouvée en solution dans le cytosol) diminue au cours du temps pour deux raisons probables : une partie peut sans doute **ressortir** dans le milieu extracellulaire ; une autre **peut encore être incorporée** dans les protéines, même si ce phénomène reste très marginal.
**5.** La quantité de protéines radiomarquées reste à peu près **invariante** de t0 à t90 min, ce qui montre bien qu'il n'y a plus d'incorporation de glycine $^3H$ après t0, comme le prévoit le protocole ; ce dernier est nommé : **pulse-chasse** (cf. fiche 18).

## Trajet intracellulaire d'une protéine sécrétée

L'étude précédente concernant la synthèse de la soie est complétée par une analyse autoradiographique en microscopie électronique, après réalisation de coupes dans les glandes séricigènes marquées par la glycine $^3H$. Pour une plus grande précision, cinq temps après le t0 font l'objet de cette nouvelle analyse.
Après révélation des coupes, le nombre de grains d'argent observés sur les clichés est mesuré dans un certain nombre de compartiments cellulaires bien identifiés : le RE rugueux (RER), l'appareil de Golgi, les vésicules de sécrétion sous-apicales et les mitochondries. Cette répartition, exprimée en % et en nombre total de grains par 1 000 $\mu m^2$ de surface cellulaire, est donnée dans le tableau suivant :

| Temps en min après le t0 | 0 | 10 | 30 | 45 | 65 | 90 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| – Nombre total de grains/1 000 $\mu m^2$ | 2 080 | 2 150 | 2 040 | 1 980 | 1 430 | 620 |
| – Nombre de grains dans le RER | 95 % | 78 % | 56 % | 30 % | 15 % | 12 % |
| – Nombre de grains dans le Golgi | 3 % | 13 % | 36 % | 26 % | 18 % | 15 % |
| – Nombre de grains dans les vésicules | 0 % | 5 % | 6 % | 40 % | 65 % | 69 % |
| – Nombre de grains dans les mitochondries | 2 % | 4 % | 2 % | 4 % | 2 % | 4 % |

**1.** Décrivez l'évolution du nombre total de grains par unité de surface cellulaire, et rapprochez les résultats de cette analyse de ceux trouvés dans l'exercice précédent.
**2.** Analysez l'évolution du nombre de grains dans les trois compartiments du réseau endomembranaire au cours de temps ; que concluez-vous ?
**3.** Que pensez-vous de l'évolution du nombre de grains dans les mitochondries ?
Si on ajoute de la cytochalasine B (drogue connue pour inhiber la polymérisation des microfilaments d'actine) au milieu de survie, le nombre total de grains ne varie pas pendant la durée de l'expérience, mais les % restent en revanche inchangés.
**4.** Que concluez-vous en ce qui concerne le processus de sécrétion ?

## Solution

**1.** Le nombre absolu de grains d'argent par unité de surface **reste invariant** jusqu'à 45 min, mais **diminue** rapidement par la suite. Ces grains représentent les protéines radioactives **présentes dans les cellules**, et donc essentiellement la soie marquée. Cette diminution est à comparer à la stabilité des dpm observée pendant les 90 min de l'expérience, mais **au niveau de la glande entière**. Cette contradiction apparente s'explique par le fait que la soie est évacuée des cellules par **exocytose** (voir plus loin), mais reste stockée dans les cavités de la glande pendant un certain temps.
**2.** Le **RER** est le compartiment qui est marqué en premier, pendant le « pulse », et c'est donc celui dans lequel la synthèse protéique débute ; la radioactivité diminue ensuite très rapidement dans ce compartiment pendant toute la période dite de « chasse ». **L'appareil de Golgi** est marqué dans un deuxième temps, le pic de marquage étant atteint au bout de 30 min : les protéines radioactives sont donc passées du RER vers ce compartiment. Puis sa radioactivité diminue également.
Enfin, les **vésicules de sécrétion** commencent à se « remplir » de protéines marquées lorsque l'appareil de Golgi se « vide » lui-même. On notera que le nombre absolu de grains d'argent diminue à ce moment-là, qui correspond à **l'exocytose** (évacuation à l'extérieur de la cellule) des premières molécules de soie radioactive. Ce trajet intracellulaire des protéines sécrétées est celui décrit par Palade sur le pancréas exocrine.
**3.** Le marquage des mitochondries reste faible et relativement **invariant** tout au long de l'expérience ; ceci est dû au fait qu'il n'y a pas d'échanges entre ce compartiment et ceux impliqués dans le trafic des protéines sécrétées. Ce marquage indique cependant qu'**elles reçoivent des protéines radiomarquées** (cf. fiche 25).
**4.** Cette inhibition de l'exocytose montre que les microfilaments sont impliqués dans la dernière étape du processus de sécrétion, à savoir le **guidage des vésicules** de sécrétion vers la membrane plasmique et l'exocytose de la soie.

FICHE 18

# L'appareil de Golgi

## I Les modifications des protéines et la synthèse des polysaccharides

Cet organite présent chez toutes les cellules eucaryotiques a depuis longtemps été mis en évidence sous la forme d'un réseau serré entourant le noyau, à proximité du centrosome. Les études fonctionnelles ont montré ses relations étroites avec le RE rugueux lors du processus de sécrétion des protéines dans les cellules animales (cf. fiche 17), mais il ne s'agit pas d'un simple compartiment de transit ou de concentration de protéines : de nombreuses fonctions lui sont spécifiques.

• **Organisation de l'appareil de Golgi :** celui-ci est constitué de complexes de sacs unimembranaires aplatis, de forme incurvée et empilés les uns sur les autres : les **dictyosomes**, qui montrent en outre une **polarité structurale et enzymatique** très marquée. Dans les cellules sécrétrices, ils sont en contact étroit avec le RE rugueux, duquel ils reçoivent du matériel *via* de nombreuses vésicules ; leur face tournée vers la membrane plasmique émet de grosses vésicules destinées à l'**exocytose**, dont le contenu sera sécrété, et dont la membrane ira enrichir la membrane cytoplasmique.

• **Les fonctions du Golgi des cellules animales :** elles consistent essentiellement en des modifications post-traductionnelles des protéines, qui sont de deux types :

- *une activité de glycosylation* ; la modeste **glycosylation** effectuée dans le RER (de type N-glyc.) est poursuivie, des modifications étant apportées aux motifs sucrés ajoutés aux protéines dans ce compartiment ; son rôle dans l'adressage des protéines sera traité dans la fiche suivante. En outre, on y décrit une autre activité intense de glycosylation : O-glyc., qui conduit à des molécules parfois très riches en sucres : les **glycoprotéines** ou les **protéoglycanes** membranaires ou sécrétés (cf. fiche 27).
- *une activité de clivage des protéines* ; de nombreuses protéines : hormones, enzymes, neuromédiateurs, sont issues d'un **découpage en plusieurs fragments** d'une longue chaîne polypeptidique synthétisée dans le RER ; ce dernier a lieu dans les saccules les plus tardifs du Golgi ou dans les vésicules de sécrétion qu'il émet.

• **La synthèse de polysaccharides chez les Végétaux :** plusieurs constituants des parois des cellules végétales sont synthétisés dans le Golgi et exocytés (cf. fiche 27).

## II Les expériences de « pulse-chasse »

Ces expériences ont été construites pour étudier l'assimilation des précurseurs radioactifs dans des cellules vivantes et leur incorporation dans des macromolécules au cours du métabolisme. Elles ont historiquement permis de décrire le trajet intracellulaire des protéines sécrétées, depuis le RE rugueux jusqu'à l'extérieur des cellules (cf. fiche 17). Actuellement, elles sont remplacées par des expériences basées sur l'utilisation de la GFP (cf. fiche 28), beaucoup plus sophistiquées au plan technique, mais permettant de visualiser directement les processus cellulaires.

• **Principe des expériences :** elles sont conduites en deux temps :

– le « **pulse** » : des cellules vivantes sont mises en présence d'un précurseur radioactif destiné à être spécifiquement incorporé dans certaines de leurs macromolécules ; par exemple, un acide aminé sera utilisé pour marquer les protéines, un nucléoside sera utilisé pour les acides nucléiques… Ce traitement doit être **de courte durée**, par rapport à la celle des processus analysés, mais suffisant pour que le marquage soit détectable (le précurseur sera donc fortement radioactif) ;

– la « **chasse** » : il s'agit en fait d'une période de « poursuite » des macromolécules radioactives formées pendant la période du pulse. Après ce dernier, les cellules sont enlevées du milieu radioactif, soigneusement rincées pour éliminer le maximum de précurseur marqué, et transférées dans un nouveau **milieu de survie non radioactif**.

Pendant cette période, les cellules poursuivent leur métabolisme normal, mais les nouvelles molécules synthétisées ne sont plus radioactives. Les molécules marquées précédemment, qui sont engagées dans des processus de transport intracellulaire et/ou de modifications chimiques divers, pourront alors être facilement analysées.

• **Mise en œuvre du protocole :** au cours de la chasse, des échantillons identiques de cellules sont prélevés à intervalles réguliers puis analysés par diverses techniques cytologiques et biochimiques. Les macromolécules marquées étant repérables sur des coupes par **l'autoradiographie** (cf. fiche 17) et analysables biochimiquement à partir **d'extraits acellulaires** (cf. fiche 15), il est possible d'aborder les questions de physiologie cellulaire sous un angle dynamique, dans l'espace et dans le temps.

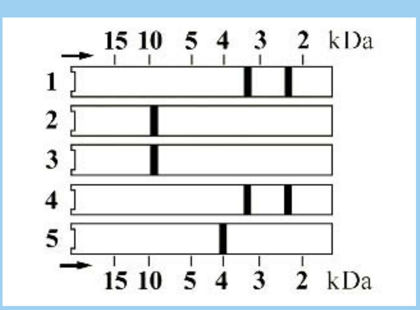
La lisibilité des réponses est d'autant meilleure que la population de molécules marquées est la plus « ponctuelle » qui soit ; ceci est donc lié à la netteté des bornes du pulse, dont **l'arrêt doit être aussi rapide que possible**. À cet effet, on ajoute en général dans le milieu de survie de la chasse, une forte concentration de précurseur non marqué ; son entrée massive dans la cellule va abondamment diluer le traceur subsistant dans le cytoplasme et provoquer de manière artificielle une diminution brutale de son incorporation dans la macromolécule correspondante (cf. fiche 17).

# Synthèse de l'insuline

L'insuline est une hormone hypoglycémiante sécrétée par les cellules béta des îlots de Langerhans du pancréas. Elle est constituée de deux chaînes polypeptidiques liées par des ponts disulfure : la chaîne A (2,3 kDa) et la chaîne B (3,3 kDa).
Les expériences suivantes sont destinées à analyser les modalités de sa synthèse :
1) un anticorps a été fabriqué contre chacune des deux chaînes polypeptidiques : anti-A et anti-B, afin d'être utilisés dans des expériences de western blot (cf. fiche 23) ;
2) lors d'expériences de fractionnement cellulaire (cf. fiche 15) des cellules béta, des fractions protéiques purifiées ont été obtenues à partir du RE rugueux (RER), de l'appareil de Golgi et des vésicules de sécrétion ;
3) ces fractions sont ensuite soumises à une électrophorèse en gel dénaturant SDS, en présence de mercapto-éthanol (cf. fiche 9) ;
4) un western blot a été effectué avec un mélange des deux anticorps sur les échantillons suivants, après électrophorèse :

canal 1 : insuline plasmatique (purifiée à partir du sang)
canal 2 : fraction obtenue à partir du RER
canal 3 : fraction obtenue à partir du Golgi
canal 4 : fraction obtenue à partir des vésicules de sécrétion

Le schéma suivant montre le résultat obtenu :




**1.** À partir de l'analyse du canal 1, rappeler l'intérêt des expériences de western blot.
**2.** Comment peut-on interpréter le résultat obtenu dans le canal 2 ?
**3.** Même question pour le résultat obtenu dans le canal 3.
**4.** Quelle conclusion tirez-vous de l'analyse du canal 4, et quelle question ce résultat conduit-il à poser concernant la synthèse de l'insuline ?
Après purification de la protéine de 9,5 kDa détectée dans le RER, on a obtenu un nouvel anticorps contre cette molécule. Ce dernier a été testé en western blot sur la fraction obtenue à partir des vésicules de sécrétion ; pour le résultat, voir le canal 5.
**5.** Quelle information importante ce nouveau résultat apporte-t-il ?
**6.** À partir de toutes ces données, résumer les modalités de synthèse de l'insuline.

## Solution

**1.** Grâce à l'utilisation d'**anticorps spécifiques** visualisables par des enzymes qui leur sont greffées, il est possible de détecter la présence de protéines bien particulières séparées par un gel d'électrophorèse (cf. fiche 23). Ici, les deux anticorps ont permis de mettre en évidence les deux chaînes de l'insuline, séparées dans ce gel au moyen du mercapto-éthanol, qui est connu pour **rompre les ponts disulfure**. En son absence, on n'aurait donc observé qu'une seule bande de 5,6 kDa.
**2.** On n'observe **qu'une seule bande**, dont la taille est voisine de 9,5 kDa ; cette chaîne polypeptidique unique est apparentée à l'insuline puisqu'elle est reconnue par les anticorps. Les deux petites bandes typiques de l'insuline active n'existent pas dans cet organite, qui est le point de départ de la synthèse des protéines sécrétées. On peut émettre l'hypothèse que cette forme longue contenue dans le RER est un **précurseur** qui contient les deux segments de petite taille.
**3.** Le résultat observé pour le Golgi montre que cet organite est un simple lieu de transit pour la forme longue de 9,5 kDa, qui n'y subit **aucune modification**.
**4.** Au sein des vésicules de sécrétion, on trouve les chaînes de 2,3 et de 3,3 kDa typiques de l'insuline, qui seront exocytées. La question posée est celle du **mécanisme moléculaire** faisant passer de la forme longue unique à ces deux petits fragments associés par des ponts disulfure (phénomène de **maturation**).
**5.** Ce nouvel anticorps reconnaît dans les vésicules de sécrétion **un polypeptide de 4 kDa** environ, différent de ceux de 2,3 et de 3,3 kDa, car il ne les reconnaît pas. Si l'on additionne les masses moléculaires des 3 chaînes contenues dans ces vésicules, on tombe sur une valeur proche de 9,5 kDa (valeur attribuée au **précurseur** de grande taille évoqué dans la réponse 2).
**6.** La synthèse de l'insuline débute dans le RER, où une chaîne de 9,5 kDa est fabriquée par insertion cotraductionnelle. Après stabilisation de sa structure tridimensionnelle grâce aux **ponts disulfure**, elle passe dans l'appareil de Golgi, puis est envoyée dans les vésicules de sécrétion où **cette chaîne est découpée** en 3 fragments ; deux seulement sont conservés dans la molécule qui subira l'exocytose.

## Glycosylation d'une protéine membranaire

Le récepteur des LDL (*low density lipoproteins*) est une glycoprotéine membranaire rencontrée dans la plupart des cellules, chez l'Homme. Sa masse moléculaire (MM) est de 160 kDa et sa chaîne polypeptidique unique comporte 839 acides aminés.
**1.** Calculer la proportion de sucres dans la masse finale de la molécule, sachant que la MM moyenne d'un acide aminé est de 110 Da.

La synthèse de ce récepteur est effectuée, à partir de son ARNm purifié, dans un système de traduction *in vitro* auquel on ajoute des microsomes issus du RER, ainsi qu'un mélange de trois sucres simples : glucose, mannose et galactose. Dans trois expériences séparées, le marquage de la protéine néosynthétisée est réalisé avec trois précurseurs radioactifs différents : la leucine $^{3}H$, le mannose $^{3}H$ et le galactose $^{3}H$.
Avec les deux premiers marqueurs, on obtient bien une chaîne radioactive, dont la MM est estimée à 120 kDa ; avec le galactose, la molécule obtenue a la même MM, mais elle n'est pas radioactive. Lorsque cette molécule est traitée avec une glycosidase, enzyme qui décroche les chaînes sucrées, sa MM est alors de 92,3 kDa.
**2.** Quelles conclusions tirez-vous de ces différentes expériences ?
Grâce à un fractionnement cellulaire de cellules hépatiques, il est possible de purifier des vésicules d'origine golgienne, dont les protéines membranaires peuvent être analysées : on y retrouve le récepteur des LDL, et sa MM est alors de 160 kDa.
**3.** Quelle information complémentaire apportent ces expériences en ce qui concerne les mécanismes de glycosylation du récepteur des LDL ?

## Solution

**1.** La chaîne polypeptidique a une MM de : 839 × 110 = 92 300 Da = 92,3 kDa.
Par rapport à la masse totale, ceci représente la proportion suivante, : 92,3/160 = 57,7 %. La masse relative de sucres est donc de 100 – 57,7 = **42,3 %**.
**2.** En présence de microsomes et de sucres simples, précurseurs des polysaccharides, on obtient une chaîne de 120 kDa, ce qui suggère un phénomène de **glycosylation** de la protéine. Ceci est confirmé par les expériences de marquage qui montrent une **incorporation de mannose $^{3}H$** lors de la synthèse. En revanche, le galactose $^{3}H$ n'est pas incorporé, ce qui montre qu'il n'entre pas dans la constitution des chaînes sucrées ajoutées à la protéine. La glycosidase décroche tous les sucres.
**3.** Dans **l'appareil de Golgi**, le récepteur existe sous la même forme (160 kDa) que dans la membrane plasmique. C'est lors du passage dans cet organite, spécialisé dans la **glycosylation des protéines**, qu'il acquiert sa composition et sa taille définitives. On rappelle que la nature de la glycosylation n'est pas la même dans le RER (N-glyc.) et dans le Golgi (O-glyc.).

FICHE 19

# Les lysosomes ; les vacuoles végétales

## I Des organites à fonction de digestion et de stockage

Ils appartiennent au réseau endomembranaire étudié précédemment et constituent un compartiment terminal pour de nombreuses protéines d'origine golgienne. Les lysosomes renferment un nombre élevé d'enzymes susceptibles d'hydrolyser la plupart des macromolécules connues. Les vacuoles ont une origine et des fonctions voisines, mais leur grand développement et leur capacité de stockage d'importants volumes d'eau leur confèrent des propriétés originales et capitales chez les plantes.

• **Les lysosomes, un compartiment très hétérogène :** on rassemble sous ce nom des organites unimembranaires très **polymorphes**, dont la taille peut aller de 0,1 à plusieurs μm, et dont le contenu est extrêmement variable et hétérogène. Leur point commun est la cinquantaine **d'hydrolases acides** (concentrées dans des vésicules émises à partir du Golgi), ce qui permet de les mettre en évidence sans ambiguïté grâce à des **tests cytoenzymologiques** (cf. fiche 20).
Leur lumière est acidifiée grâce à l'intervention, après fusion membranaire, d'une pompe à protons provenant du compartiment endosomal. À partir de ce moment, les enzymes peuvent digérer le contenu organique qui y a été accumulé.

• **La fonction lytique des lysosomes :** leur rôle consiste à digérer des substances exogènes absorbées par endocytose : **hétérophagie**, ou des territoires cellulaires qui ont été séquestrés par des membranes : **autophagie**. Toutes les cellules qui se nourrissent par phagocytose, qu'il s'agisse d'êtres unicellulaires (Protistes), ou bien qu'elles appartiennent à des êtres multicellulaires (cellules défensives), mettent en œuvre ces organites. Ces derniers assurent aussi le renouvellement cellulaire et le modelage de certains organes, chez l'embryon et chez l'adulte.

• **Les vacuoles :** elles occupent un volume important dans les cellules différenciées, telles que celles des parenchymes ; chez les cellules méristématiques, leur origine peut être tracée dans l'appareil de Golgi. Leur lumière est riche en hydrolases, mais elles ont aussi une activité de stockage de **métabolites secondaires** et de diverses macromolécules. Elles jouent en outre un rôle dans le maintien et la **croissance** cellulaires.

# II Les sondes fluorescentes

Depuis peu, les Biologistes disposent d'un grand nombre de composés fluorescents leur permettant de visualiser et quantifier non seulement des activités enzymatiques au sein des cellules vivantes, mais également de détecter des ions particuliers au sein du cytoplasme ou de mesurer le pH dans la lumière de tel ou tel organite. Grâce à ces sondes fluorescentes d'activités métaboliques, il est désormais possible de suivre des phénomènes physiologiques parfois très rapides, et en temps réel, au microscope à fluorescence (cf. fiches 4 et 8).

• **Un exemple historique :** le diacétate de fluorescéine est un composé de ce type utilisé depuis longtemps comme **test de viabilité** des grains de pollen. Ce composé hydrophobe traverse la membrane plasmique et pénètre donc aisément dans les cellules vivantes ; au sein du cytoplasme, des estérases variées le décomposent et en libèrent la **fluorescéine**, qui fluoresce en vert. Cette dernière est hydrophile et ne peut franchir les membranes, de sorte que la **grande vacuole centrale** d'une des cellules du grain de pollen n'est pas colorée alors que le cytoplasme l'est.

- Sur le même principe, on connaît d'autres molécules permettant de visualiser de manière très spécifique certains organites des cellules animales. Ainsi, la cathepsine, une **protéase caractéristique des lysosomes**, clive un substrat organique libérant une molécule fluorescente, ce qui fait apparaître ces organites comme des points brillants. Dans ces deux exemples, on parle de **substrats fluorogéniques**.

• **Autres sondes fluorescentes :** elles ont été développées pour fonctionner dans un contexte physicochimique bien particulier, ce qui permet de repérer soit les organites dans lesquels celui-ci est réalisé en permanence, soit d'identifier des conditions transitoires pendant lesquelles tel ou tel territoire cellulaire le réalise, sous l'action d'un stimulus externe, par exemple.

Les **mitochondries** accumulent spécifiquement des composés tels que le DASPMI ou la rhodamine 123, sous l'action du gradient transmembranaire de protons, ce qui les rend intensément fluorescentes.

Des indicateurs sensibles aux ions ne fluorescent qu'en leur présence, et de manière quantitative ; le **pH intracellulaire** (concentration en $H^+$), ou la concentration en **ions $Ca^{2+}$ libres**, très impliqués dans divers phénomènes de signalisation (cf. fiche 28) peuvent être mesurés, et leurs variations suivies seconde après seconde.

La difficulté est que certains de ces indicateurs **ne peuvent rentrer spontanément** dans les cellules par diffusion, et bien souvent il est nécessaire de les injecter, de les faire entrer par électroporation ou en utilisant des liposomes (cf. fiche 26).

# Les lysosomes : des organites digestifs originaux

La fonction première des lysosomes est la dégradation de molécules prélevées dans le milieu extérieur ou dans le cytoplasme ; la présence dans leur lumière d'enzymes caractéristiques a été à la base de leur découverte. Répondre par Vrai ou Faux aux propositions suivantes qui illustrent cette fonction de digestion.

**1.** Le pH de la cavité des lysosomes (5-6) est maintenu grâce à une pompe à protons membranaire qui chasse en permanence les $H^+$ de cette cavité vers le cytosol.

**2.** La membrane des lysosomes possède une bicouche lipidique exceptionnellement perméable aux petites molécules chargées issues de l'hydrolyse des macromolécules.

**3.** Chez les Animaux, les enzymes lysosomales sont généralement confinées à ces organites et ne font pas l'objet d'une exocytose.

**4.** On appelle « corps résiduels » des vésicules contenant des enzymes lysosomales inactivées et n'ayant jamais été en contact avec leurs substrats normaux.

**5.** L'ensemble des hydrolases contenues dans les lysosomes est capable de digérer pratiquement toutes les macromolécules connues chez les êtres vivants.

**6.** Certains Protistes et certains Animaux inférieurs ont un besoin absolu en lysosomes pour assurer la digestion de leurs proies ou particules alimentaires.

**7.** Après leur phagocytose, toutes les bactéries sont détruites dans les lysosomes des cellules assurant la défense de notre organisme : leucocytes et macrophages.

**8.** Il existe de nombreuses maladies génétiques liées à des anomalies des lysosomes.

## Solution

**1. Faux** : pour maintenir le pH acide de leur lumière, cette pompe concentre au contraire les protons dans les lysosomes.

**2. Faux** : en revanche, la membrane des lysosomes est très riche en transporteurs protéiques (cf. fiche 4) permettant aux petites molécules (chargées ou pas) de gagner le cytosol pour y être utilisées comme métabolites.

**3. Vrai** : cette exocytose n'a normalement pas lieu, car elle aurait des conséquences fatales pour l'organisme (en particulier, destruction des matrices extracellulaires).

**4. Faux** : il s'agit au contraire de vésicules contenant des molécules n'ayant pas pu être digérées par les enzymes lysosomales.

**5. Vrai** : pratiquement toutes les macromolécules organiques peuvent être digérées, mais il existe cependant des exceptions, qui sont à l'origine des corps résiduels.

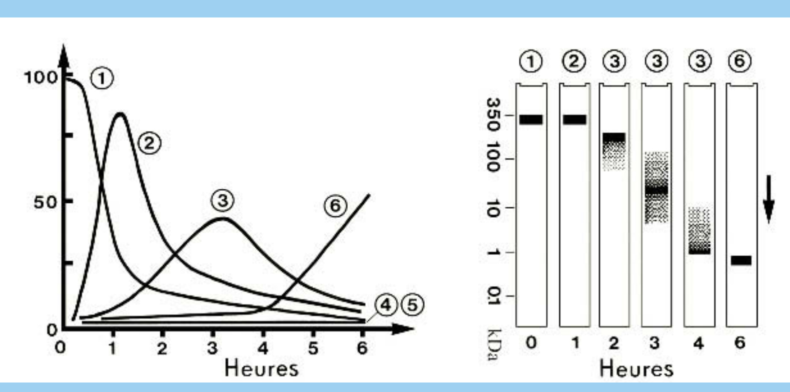
**6. Vrai** : les Ciliés, les amibes, se nourrissent par phagotrophie et utilisent ces organites pour leur nutrition ; c'est également vrai pour les Éponges, les Cnidaires…

**7. Faux** : certaines espèces de bactéries : *Listeria*, *Mycobacterium tuberculosis* (agent de la tuberculose), *Legionella pneumophila* résistent à cette destruction.

**8. Vrai** : si les enzymes lysosomales sont « mutées », elles peuvent être incapables de remplir leur fonction de digestion : on parle alors de maladies de « surcharge ».

## Synthèse des hormones thyroïdiennes

Chez les Vertébrés, les hormones thyroïdiennes T3 et T4 (tri- et tétra-iodothyronine) sont fabriquées au niveau de la thyroïde, une glande formée de petites structures épithéliales creuses appelées follicules. Ces follicules contiennent une glycoprotéine nommée thyroglobuline (660 kDa), qui est fabriquée par les cellules épithéliales, sécrétée, iodée et enfin provisoirement stockée dans leur cavité (la colloïde). Cette protéine est à l'origine de la production des hormones T3 et T4 après la mise en œuvre de mécanismes cellulaires originaux.
Ceux-ci sont analysés dans cet exercice, à travers les expériences suivantes :
1) des follicules thyroïdiens sont disséqués et incubés pendant 1 h dans un milieu de survie contenant de l'iode radioactif ($^{131}I$). À la suite de cette incubation, on peut vérifier que la thyroglobuline contenue dans la cavité est devenue radioactive.
2) on peut stimuler *in vitro* la sécrétion des hormones T3/T4 par les follicules, au moyen d'une hormone hypophysaire, la TSH.
Une étude autoradiographique et biochimique est ensuite conduite sur les follicules à partir du temps t0 où la sécrétion est provoquée (période de chasse de 6 h) :
3) cinq compartiments sont étudiés en autoradiographie électronique (cf. fiche 17) : la cavité des follicules (1), les vésicules d'endocytose (2), les lysosomes (3), l'appareil de Golgi (4) et le cytosol (5). Parallèlement, la radioactivité est mesurée dans le milieu de survie (6) pendant toute la chasse.
4) les protéines de certains de ces compartiments sont purifiées par fractionnement cellulaire, et analysées par électrophorèse en SDS et autoradiographie des gels.
La figure suivante montre les résultats de ces deux expériences :



**1.** Décrivez le trajet cellulaire des molécules radiomarquées au cours de la chasse.
**2.** Qu'advient-il de la thyroglobuline tout au long de ce trajet, en particulier dans les lysosomes, et quel produit trouve-t-on dans le milieu extérieur à la fin de la chasse ?
**3.** En quoi le mécanisme de synthèse de ces hormones est-il très original ?

## Solution

**1.** Le premier compartiment marqué est évidemment la **cavité des follicules**, dans lesquels la thyroglobuline marquée par l'iode au cours du pulse a été accumulée. En même temps que ce compartiment se vide de sa radioactivité, on observe que les **vésicules d'endocytose** se marquent rapidement et brièvement à leur tour.
Ensuite, selon les mêmes modalités, on voit les **lysosomes** se charger, mais plus lentement ; puis la radioactivité y diminue alors que le milieu de survie commence à devenir radioactif. Les lysosomes sont visiblement les organites dans lesquels les molécules marquées séjournent le plus longtemps.
**2.** Les électrophorèses en SDS montrent que le composé radioactif contenu dans les follicules a une masse moléculaire voisine de 330 kDa, ce qui suggère d'abord que la thyroglobuline est formée de **2 sous-unités** de taille identique. On la retrouve telle quelle, au bout d'1 heure, dans les vésicules d'endocytose qui ont **capturé cette molécule** dans la cavité folliculaire, au niveau de la membrane plasmique apicale des cellules épithéliales (les thyréocytes).
En revanche, dans les lysosomes, on observe au cours du temps (points 2, 3 et 4 h) une **diminution progressive de la taille** des molécules qui y atteignent 1 kDa seulement ; ceci prouve qu'une digestion de la thyroglobuline en peptides de plus en plus courts a eu lieu dans ces organites, ce qui est cohérent avec le fait qu'ils contiennent des hydrolases, et en particulier des **protéases**.
Au bout de 6 h, le milieu contient un composé renfermant de l'iode radioactif, dont la masse moléculaire est de l'ordre de 0,8 kDa : il s'agit des hormones T3 et T4, qui ont été **sécrétées par exocytose** sur la face opposée à celle de la cavité folliculaire.
**3.** Ce mécanisme de synthèse des hormones thyroïdiennes est original, car il se réalise en deux étapes très différentes se déroulant dans les mêmes cellules : les thyréocytes. Tout d'abord, la **thyroglobuline est synthétisée et sécrétée** dans la cavité folliculaire, selon la voie classique de sécrétion (cf. fiche 17) : RER, Golgi, vésicules et exocytose. Ensuite, sous l'action d'un stimulus (la TSH), les cellules reprennent la tyroglobuline par endocytose, **la dégradent dans les lysosomes** en la découpant en fragments d'où proviennent les hormones T3 et T4, qui sont des **dipeptides** constitués de 2 tyrosines iodées (avec 3 ou 4 atomes d'Iode).

FICHE 20

# Les mitochondries : morphologie et organisation

## I Les mitochondries, des organites présents chez tous les Eucaryotes

Toutes les activités cellulaires consomment de l'énergie, et une seule molécule est universellement utilisée comme moyen de fournir de l'énergie aux réactions endergoniques du métabolisme, aux transports actifs des ions ou des molécules organiques, aux mouvements intracellulaires et ceux des cellules elles-mêmes. Il s'agit de l'**ATP** (Adénosine tri-phosphate ; voir l'encart suivant) dont l'essentiel est fabriqué, dans des conditions d'aérobiose, par les mitochondries. Tous les Eucaryotes (à l'exception de quelques rares groupes de Protistes, qui les ont en fait perdues au cours de l'Évolution) possèdent des mitochondries, y compris les Végétaux verts, contrairement à une idée fausse et assez couramment répandue !

• **Observation en microscopie photonique :** les mitochondries se présentent comme des granules plus ou moins allongés, dont la taille est voisine de 0,5 à 1 µm ; parfois filamenteuses, elles peuvent atteindre une dizaine de µm de long ; leur forme est spécifique du type cellulaire considéré. On compte environ 1 500 mitochondries globulaires dans un hépatocyte.
L'utilisation de **colorations physiques** (cf. fiche 2) associées au microcinéma ou à la vidéomicroscopie montre que ces organites sont déformables, animés de mouvements et capables de se déplacer au sein du cytoplasme. Certaines **colorations cytochimiques**, très spécifiques, sont un moyen aisé de visualiser de façon indiscutable les mitochondries, malgré leur petite taille (voir la suite).

• **Observation en microscopie électronique :** voir l'exercice proposé dans cette fiche : un schéma légendé de l'ultrastructure mitochondriale est donné.

• **Le matériel génétique des mitochondries :** ces organites se distinguent des autres (tout comme les chloroplastes, cf. fiche 22) par la présence d'une information génétique

autonome, sous la forme d'une **molécule d'ADN circulaire**. Le nombre de protéines codé par ce « chromosome » est très faible et ne suffit pas à rendre compte de toutes les protéines constitutives des mitochondries (plusieurs centaines). La mise en place des organites semi-autonomes (on parle de **biogenèse**) est un phénomène complexe, qui sera étudié dans une prochaine fiche (cf. fiche 25).

## II La détection d'enzymes *in situ* : la cytoenzymologie

La cytoenzymologie est une approche cellulaire ancienne (années 1960), qui a pour objectif de localiser des activités enzymatiques au sein des cellules vivantes (Protistes, épithéliums, tissus faciles à écraser), sur des coupes de cellules congelées (cryomicrotomie) ou sur des fractions cellulaires isolées par centrifugation (cf. fiche 15).

**• Principe de la technique :** cette méthode repose sur le fait que des enzymes situées dans des structures cellulaires peuvent être rendues visibles à travers les **produits des réactions** qu'elles catalysent. Deux conditions doivent donc être réalisées :

- les enzymes doivent être fonctionnelles (protéines non dénaturées) ;
- le (ou un des) produit(s) de la réaction doit être insoluble (pour ne pas diffuser au cours du temps), et être coloré ou opaque à la lumière (ou aux électrons pour les variantes adaptées à la microscopie électronique).

La difficulté, dans ces techniques, est donc de trouver des substrats hydrosolubles et si possible incolores pour ces enzymes, mais donnant des produits visualisables au microscope. De façon générale, ces molécules ne sont ainsi pas les substrats naturels des enzymes, mais des **analogues artificiels** élaborés par les chimistes, de façon à remplir les conditions contraignantes signalées plus haut. De nombreux contrôles doivent être réalisés pour valider les résultats de ces méthodes, toujours délicates à mettre en œuvre.

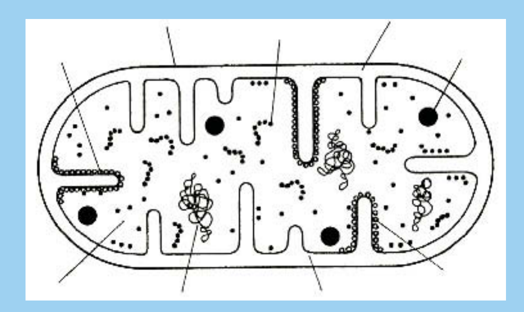
**• Exemples**

- **la succinate-déshydrogénase** catalyse la réaction d'oxydation du succinate en fumarate, dans le cycle de Krebs, en couplant cette réaction à la réduction du coenzyme FAD en **$FADH_2$**. On peut localiser cette enzyme en couplant la dernière réaction à une autre, le $FADH_2$ réduisant spontanément un composé oxydé jaune non biologique (le Nitro Bleu de Tétrazolium : NBT) en **$NBTH_2$**. Ce dernier, de couleur bleu-violet, est insoluble dans l'eau ; il s'accumule donc sur son lieu de formation, c'est-à-dire la **matrice mitochondriale**, ce qui permet de visualiser aisément cet organite. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de l'enzyme permet de valider la technique. De nombreuses autres oxydases sont détectables *in situ* selon ce principe.

– **les phosphatases**, qui catalysent l'hydrolyse de nombreux **monoesters organiques de l'acide phosphorique**, sont visualisables grâce à des réactions couplées formant un précipité noir de **sulfure de plomb** (*via* la formation de phosphate de plomb). Des variantes de ces protocoles ont été mises au point pour la microscopie électronique.

## Structure des mitochondries

Schéma de mitochondrie (observée en microscopie électronique) à légender.



Voir solution en fin de fiche.

### Formule développée de la molécule d'ATP

L'hydrolyse de l'ATP (ADP + P ou AMP + Pi-Pi) est une réaction spontanée quasiment totale, et donc très exergonique. Le couplage de cette réaction à la phosphorylation non spontanée (endergonique) d'une autre molécule (telle que le glucose, ou même une protéine) conduit à la modification des propriétés physicochimiques de cette dernière, et s'accompagne souvent de son activation.

# Les mitochondries, des organites universels

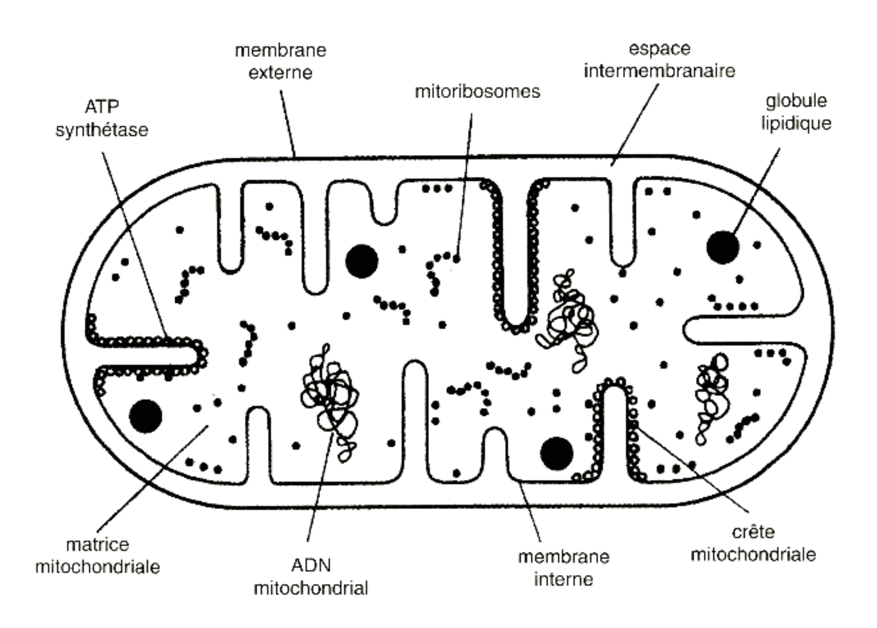
**1.** Les dimensions des mitochondries sont trop faibles pour qu'on puisse les observer avec un microscope photonique (ou à lumière). Vrai ou faux ?
**2.** Chez les Procaryotes, les mitochondries ont une organisation légèrement différente de celle décrite chez les Eucaryotes. Vrai ou faux ?
**3.** Chez un organisme complexe (un animal, par exemple), les mitochondries ont la même morphologie dans toutes les cellules. Vrai ou faux ?
**4.** Dans certaines cellules animales les membranes mitochondriales peuvent représenter la majorité de la surface membranaire de la cellule. Vrai ou faux ?
**5.** Au sein de certaines cellules animales, la répartition des mitochondries n'est pas homogène, mais en rapport avec des besoins énergétiques locaux. Vrai ou faux ?
**6.** Certaines cellules animales ne possèdent pas de mitochondries, ce qui ne les empêche pas d'avoir une durée de vie de plusieurs mois. Vrai ou faux ?
**7.** Les deux membranes limitant les mitochondries ont exactement la même composition chimique (protéines et lipides). Vrai ou faux ?
**8.** On ne rencontre jamais de granules d'amidon dans les mitochondries, quelle que soit leur origine, animale ou végétale. Vrai ou faux ?
**9.** L'ADN des mitochondries diffère chimiquement de l'ADN nucléaire car il est formé d'un seul brin. Vrai ou faux ?
**10.** Les mitochondries sont des organites faciles à purifier à partir d'homogénats cellulaires, dans un protocole de fractionnement cellulaire. Vrai ou faux ?
**11.** Les nombreuses ressemblances (morphologiques, biochimiques, génétiques…) qui existent entre les mitochondries et les bactéries sont purement fortuites. Vrai ou faux ?

## Solution

**1. Faux** : ces organites sont parfaitement **visibles**, mais leurs faibles dimensions (de l'ordre de 0,5 µm d'épaisseur) font qu'il est impossible d'observer leur organisation interne (limite de résolution du microscope photonique : 0,25 µm).
**2. Faux** : il n'existe évidemment **pas de mitochondries** dans les cellules procaryotes, qui ne sont pas compartimentées en organites.
**3. Faux** : la forme des mitochondries est **spécifique** des cellules ; elles sont, par exemple, arrondies dans les hépatocytes des Vertébrés et filamenteuses dans certaines cellules endothéliales.
**4. Vrai** : dans les cellules musculaires (celles des Insectes en particulier), les crêtes sont extrêmement nombreuses et très développées, d'où une surface considérable pouvant atteindre près de **75 % de la surface** membranaire totale.

**5. Vrai** : dans certaines cellules, les mitochondries se regroupent préférentiellement dans des territoires où la **demande en ATP** est élevée (base du flagelle des spermatozoïdes, domaine basal ou apical des cellules absorbantes…)
**6. Vrai** : les hématies (globules rouges) des Mammifères **en sont dépourvues** et elles vivent pourtant près de 4 mois en réalisant la fermentation lactique du glucose.
**7. Faux** : ces deux membranes **diffèrent profondément** par leur composition chimique et ont des propriétés physisochimiques et enzymatiques bien distinctes (cf. fiche 21).
**8. Vrai** : on ne rencontre **jamais d'amidon** dans les mitochondries, mais en revanche les chloroplastes ou les amyloplastes des végétaux en contiennent.
**9. Faux** : l'ADN mitochondrial est un **ADN standard**, double brin ; seuls certains virus ont un matériel génétique formé d'ADN simple-brin (cf. fiches 25 et 30).
**10. Vrai** : il est très aisé de purifier des mitochondries par une simple **centrifugation** d'un homogénat cellulaire, à 10 000 × g, pendant 15 minutes (cf. fiche 15).
**11. Faux** : les mitochondries, de même que les plastes, ont des « ancêtres » procaryotiques ; c'est la théorie – qui n'en est plus une – dite « endosymbiotique » de l'origine de ces organites.

## Solution



FICHE 21

# Les fonctions des mitochondries

## I Le rôle énergétique des mitochondries

C'est au sein de ces organites que se réalise la **respiration cellulaire**, c'est-à-dire l'oxydation complète des nutriments énergétiques grâce au dioxygène ($O_2$), pour en extraire un maximum d'énergie chimique, laquelle sera convertie en une autre forme d'énergie chimique : les « liaisons phosphate » contenues dans la molécule d'**ATP**.

• **La glycolyse :** la dégradation complète du **glucose**, molécule énergétique de toutes les cellules par excellence, commence dans le cytosol, au niveau de cette série linéaire de 10 réactions. Elle convertit le glucose en 2 molécules de **pyruvate** (molécule en $C_3$), tout en permettant la synthèse de 2 ATP par molécule de glucose.

• **Le cycle de Krebs :** le pyruvate est ensuite totalement dégradé dans la matrice des mitochondries, au niveau de cette succession de 9 réactions. Ce cycle conduit à la production de $CO_2$ et de « pouvoir réducteur », ensemble de molécules fortement réductrices (des coenzymes donneurs d'électrons) qui seront finalement oxydées, dans un deuxième temps, grâce à l'$O_2$. Ces **réactions d'oxydoréduction** spontanées et exergoniques seront à l'origine de la phosphorylation de l'ADP en ATP (réaction endergonique), grâce à un processus complexe qualifié de chimio-osmotique.

• **L'oxydation phosphorylante** (ou phosphorylation oxydative) : les électrons fournis par les coenzymes réduits sont pris en charge par une série de **réactions d'oxydoréduction** catalysées par de gros complexes protéiques enchâssés dans la membrane interne, et fonctionnant comme des couples redox organisés en série
Cette **chaîne de transporteurs d'électrons** assure le flux spontané des électrons jusqu'à $O_2$ ; lors de ce transport, trois réactions fortement exergoniques permettent le **pompage** (transport actif) **de protons** de la matrice vers l'espace intermembranaire, qui devient plus acide que la matrice. Le gradient transmembranaire de protons ainsi généré par la chaîne des transporteurs d'électrons est dissipé au niveau de gros complexes protéiques, les **ATP synthétases**, qui couplent le retour spontané des protons vers la matrice, à travers elles, à la synthèse d'ATP.

Les mitochondries assurent en outre diverses autres fonctions métaboliques, en particulier la dégradation des acides gras et de nombreux acides aminés.

## II Spectres d'absorption ; l'étude spectroscopique des cytochromes

De nombreuses molécules biologiques en solution aqueuse ou dans des solvants organiques, sont **capables d'absorber certaines radiations** électromagnétiques dans la gamme de la lumière visible ou de la lumière ultraviolette (UV). Ces composés, très souvent colorés, sont qualifiés de pigments ; on peut citer par exemple la chlorophylle ou l'hémoglobine.

**• L'absorption de la lumière :** cette propriété est liée à la présence dans ces composés de groupements chimiques dont les électrons de certains atomes peuvent être excités par des photons d'une longueur d'onde particulière, et portés à un niveau d'énergie supérieur à leur niveau de base. C'est en particulier le cas des molécules qui possèdent des cycles présentant des **double-liaisons conjuguées** : acides aminés aromatiques, bases nucléiques, groupements héminiques, ou de longues chaînes avec une alternance de double-liaisons et de liaisons simples : caroténoïdes.
Les électrons de ces structures sont dits « délocalisés » car ils forment une sorte de nuage (autour de la molécule de tétrapyrrole d'un hème, par exemple) favorisant la capture des photons. L'énergie capturée est restituée sous forme de chaleur ou d'une lumière de longueur d'onde plus grande (fluorescence ; cf. fiches 4 et 8).

**• La mesure de l'absorption :** l'absorption de photons de certaines longueurs d'onde lumineuses est rendue visible grâce à un **spectrophotomètre**. Cet appareil produit toutes les longueurs d'onde (spectre visible et UV) et est capable de mesurer l'intensité d'un faisceau lumineux d'une longueur d'onde donnée ayant traversé une solution de la molécule considérée. La mesure de la quantité de lumière absorbée pour chaque longueur d'onde est tracée en fonction de ces dernières pour toute la gamme UV-visible (240-800 nm) ; on obtient un « **spectre d'absorption** » dont le profil est caractéristique de la molécule étudiée. Les spectres des chlorophylles et des pigments photosynthétiques en général sont un exemple classique (cf. fiche 23).

**• Les cytochromes :** c'est grâce à ces méthodes qu'ils ont été identifiés depuis fort longtemps (D. Keilin, 1925). En utilisant des fragments de muscles d'insectes, cet auteur a mis en évidence trois bandes d'absorption caractéristiques, situées dans la gamme 540-610 nm. Ces bandes ne sont visibles qu'en conditions d'**anaérobiose** (elles disparaissent en présence de $O_2$) ou en présence d'un poison violent tel que le **cyanure** ;

l'utilisation de diverses drogues ainsi que l'observation de stabilités différentes en fonction de la chaleur, ont conduit Keilin à conclure à l'existence de trois types de molécules, connues actuellement sous le nom de cytochromes b, c et a/a3. L'ordre de fonctionnement de ces molécules dans une chaîne d'oxydoréduction a pu aussi être établi grâce à cette approche.

## Activité respiratoire des mitochondries

Lors d'un effort violent et soutenu (du type course de 400 mètres), un athlète est parfois confronté à un problème de crampes, qui sont dues à l'accumulation d'acide lactique dans les muscles. Cette molécule, qui passe ensuite dans le sang, dérive directement de l'acide pyruvique (acide à trois atomes de C) issu de la glycolyse, après fixation de deux atomes d'hydrogène apportés par un coenzyme réduit.

**1.** Dans quel compartiment cellulaire se déroulent les 10 étapes de la glycolyse ?

**2.** Quel est le devenir de l'acide pyruvique dans les conditions « normales » de vie des cellules (en aérobiose) ?

**3.** Dans quel compartiment de la mitochondrie le cycle de Krebs se déroule-t-il ?

**4.** Quelles sont les molécules produites lors d'un tour de cycle de Krebs ?

**5.** Quel est le compartiment le plus acide dans une mitochondrie, et pourquoi ?

**6.** Quelle est la molécule produite à la fin de la chaîne respiratoire, résultant de l'oxydation des coenzymes réduits ?

**7.** Comment interprétez-vous biochimiquement le fait que les cellules musculaires ne puissent plus dégrader de façon complète l'acide pyruvique, lors d'un effort intense et de longue durée ?

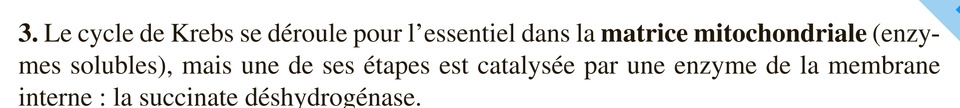
**8.** Comment appelle-t-on le processus biochimique conduisant à la formation d'acide lactique dans ces cellules ?

**9.** Pourquoi parle-t-on de « couplage chimio-osmotique » pour décrire le mode de fonctionnement des mitochondries et de synthèse de l'ATP ?

## Solution

**1.** Ces 10 étapes se déroulent au sein du **cytosol**, en phase soluble, chacune d'elles étant catalysée par une enzyme spécifique.

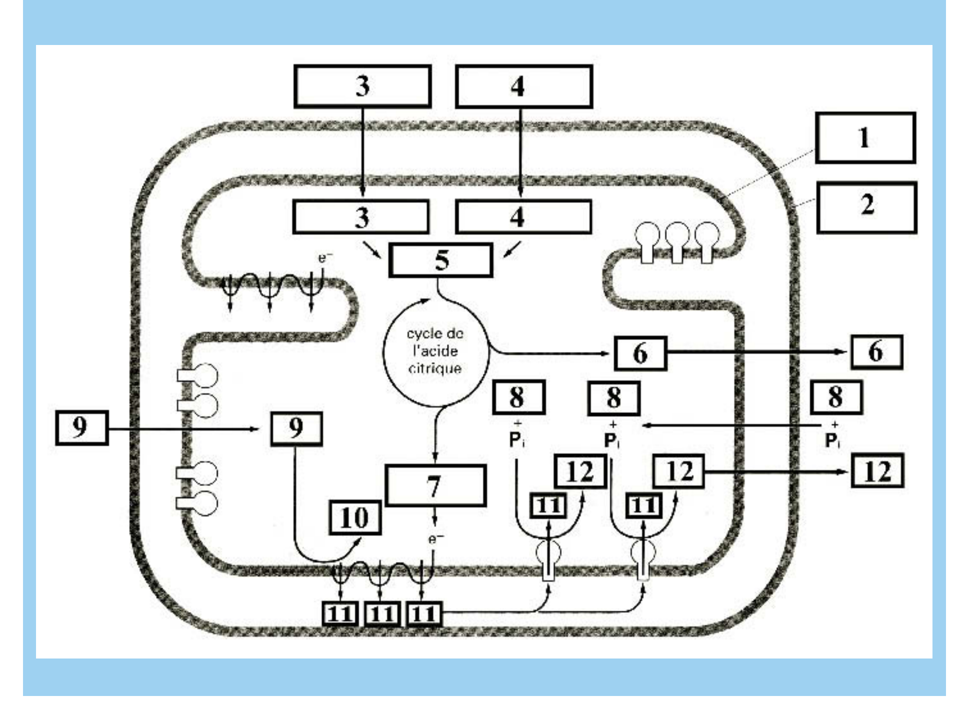
**2.** Dans les conditions « normales » d'aérobiose, l'acide pyruvique pénètre dans les mitochondries et donne de **l'acétyl-coenzyme A** (acétyl-CoA) dont le groupement acétyle ($CH_3CO$) entre dans le cycle de Krebs. Cette réaction produit également une molécule de $\mathbf{CO_2}$ et une molécule de **NADH + $\mathbf{H^+}$.** Dans le cycle de Krebs, le groupement acétyle de l'acétyl-CoA est entièrement dégradé en $CO_2$ et « pouvoir réducteur » (sous forme de coenzymes réduits).



**3.** Le cycle de Krebs se déroule pour l'essentiel dans la **matrice mitochondriale** (enzymes solubles), mais une de ses étapes est catalysée par une enzyme de la membrane interne : la succinate déshydrogénase.
**4.** Au cours d'un tour de cycle, on obtient **3** molécules de NADH + $H^+$, **1** molécule de $FADH_2$, **1** molécule de GTP et **2** molécules de $CO_2$.
**5.** Il s'agit de **l'espace intermembranaire**, qui est un lieu d'accumulation de protons pompés à partir de la matrice grâce à certains complexes enzymatiques de la membrane interne (les complexes I, III et IV, qui sont des transporteurs d'électrons).
**6.** La molécule finale qui résulte de l'oxydation des coenzymes réduits est **$H_2O$**. Cette molécule provient de la rencontre de **$O_2$**, des **électrons** fournis par la cytochrome oxydase (dernier complexe membranaire de la chaîne des transporteurs d'électrons) et de **protons** issus de la matrice mitochondriale (libérés par le premier complexe de la chaîne lors de l'étape initiale d'oxydation des coenzymes réduits).
**7.** Lors d'un effort intense, la fourniture d'$O_2$ par les poumons est insuffisante et les cellules musculaires entrent en **anaérobiose**. En absence d'$O_2$, les coenzymes réduits ne peuvent plus être réoxydés par la chaîne respiratoire et le cycle de Krebs ne fonctionne donc plus ; la **respiration cellulaire est alors bloquée**. La glycolyse continue cependant à fournir du pyruvate qui est réduit en lactate grâce au NADH + $H^+$ qu'elle produit aussi, ce qui permet de recycler ce transporteur et de continuer à faire fonctionner cette voie métabolique (mais tout en produisant un peu d'ATP).
**8.** Il s'agit de la **fermentation lactique** ; de la même façon, nos hématies, qui sont dépourvues de mitochondries, réalisent ce métabolisme de manière « constitutive ». Certaines bactéries anaérobies réalisent aussi la fermentation lactique, ce qui permet ainsi d'obtenir le yaourt et la choucroute, mais c'est une autre histoire !
**9.** On utilise cette expression car l'ensemble des processus mis en œuvre dans ce métabolisme énergétique permet la réalisation d'une **liaison covalente** (la phosphorylation de l'ADP en ATP) grâce à des phénomènes de **transports ioniques** à travers des membranes. Le pompage des protons lors du transfert des électrons conduit à la création d'un **gradient électrochimique** transmembranaire de protons qui est ensuite dissipé au niveau des molécules d'ATP synthétase : une réaction spontanée est thermodynamiquement exergonique.

# Fonctionnement d'une mitochondrie

Schéma fonctionnel d'une mitochondrie à légender.




## Solution

**1** : membrane mitochondriale interne
**2** : membrane mitochondriale externe
**3** : acide pyruvique (ou pyruvate) provenant de la glycolyse
**4** : acides gras provenant du cytosol
**5** : acétyl coenzyme A, plaque tournante du catabolisme
**6** : $CO_2$, issu de réactions de décarboxylation
**7** : pouvoir réducteur : $NADH + H^+$, $FADH_2$
**8** : ADP (associé au phosphate inorganique : Pi)
**9** : $O_2$, l'accepteur final d'électrons dans la respiration cellulaire
**10** : $H_2O$, le « déchet » de la respiration cellulaire
**11** : protons ($H^+$) impliqués dans le gradient chimiosmotique
**12** : ATP, fabriqué au niveau des ATP synthétases

# Les plastes : organisation et diversité

## I Une grande famille d'organites

Ces organites pigmentés, caractéristiques des organismes végétaux, possèdent de nombreux points communs, structuraux et biochimiques, avec les mitochondries ; les chloroplastes, responsables de la photosynthèse, sont les plus courants. Ils présentent une grande diversité de tailles, de structures, de formes et de couleurs, en particulier chez les Protistes autotrophes. Chez les Végétaux supérieurs, la spécialisation métabolique des plastes accompagne la différenciation cellulaire.

• **L'organisation générale des plastes :** ils sont bien visibles en microscopie photonique, car leur taille (5-10 µm chez les Végétaux supérieurs) est sensiblement plus grande que celles des mitochondries. Sur le plan de l'**ultrastructure**, ces deux types d'organites sont cependant très voisins, comme le montre le schéma proposé dans l'exercice suivant (à comparer à celui présenté dans la fiche 20).
Leurs **ribosomes** sont très proches, en taille et en composition, de ceux décrits chez les bactéries, alors que ceux observés dans les mitochondries sont nettement plus petits ; ils sont tous deux sensibles à certains antibiotiques antibactériens.

• **Leur diversité morphologique et structurale dans le règne végétal :** en général, ils sont **ovoïdes** ou **lenticulaires** chez les plantes supérieures, mais chez les Algues, uni- ou multicellulaires, ils prennent des **aspects curieux** et souvent spectaculaires : en cupule, en étoile, en ruban spiralé, en réseau…
Le plus souvent uniques dans ces cellules, ils sont parfois présents en grand nombre au sein du cytoplasme. Dans certains groupes d'Algues, ils présentent **3 ou 4 membranes** limitantes, ce qui constitue un critère phylogénétique important.

• **La diversité des pigments photosynthétiques :** les chloroplastes sont le plus souvent verts, en raison de la présence de **chlorophylles**, mais différents pigments surnuméraires, lorsqu'ils sont abondants, peuvent leur conférer d'autres couleurs. Les **caroténoïdes** donnent aux plastes des couleurs jaunes ou brunes, tandis que les **phycobilines** des Algues rouges leur donnent une couleur rouge. Les conséquences physiologiques de la présence de ces molécules sont importantes (cf. fiche 23).

**• La différenciation des plastes chez les Végétaux supérieurs :** dans les cellules méristématiques, il n'existe pas de plastes différenciés, mais des **proplastes,** incolores et peu différents des mitochondries. Les **chromoplastes**, de couleur rouge, sont riches en cristaux de caroténoïdes, tandis que les leucoplastes, incolores, ont accumulé divers métabolites dans des cellules sécrétrices.
Enfin, certains sont spécialisés dans le stockage de diverses réserves, tels que les **amyloplastes** (amidon), les **protéoplastes** (protéines) et les **oléoplastes** (huiles), que l'on trouve en abondance dans les graines.

# II La chromatographie

Il s'agit d'un ensemble de méthodes permettant de séparer des molécules organiques en fonction de leurs propriétés physicochimiques : solubilité dans divers solvants, charge électrique, affinité par rapport à un groupement chimique donné… On utilise un support poreux sur lequel le mélange à étudier est déposé, et sur lequel un flux de solvant entraîne plus ou moins loin les molécules en fonction de leur aptitude à y être retenues. Ce dernier est constitué d'une feuille de papier filtre, d'une plaque recouverte de cellulose ou de silice, d'une colonne remplie de ces composants, etc.

**• La chromatographie d'adsorption :** mise au point par M. Tswett (1906), pour séparer les **pigments chlorophylliens**, elle repose sur le principe suivant : un soluté donné tend à se lier par des liaisons faibles (s'adsorber) sur un support qui fonctionne comme une **phase stationnaire** solide ; le solvant (éluant) constitue une **phase liquide et mobile** qui migre sur ce support et tend à en décrocher le soluté.
Il s'agit donc ici d'une compétition entre deux phénomènes opposés : l'adsorption et la désorption. Les différents solutés d'un mélange étant plus ou moins solidement retenus par la phase stationnaire et plus ou moins facilement décrochés par la phase mobile, il s'en suit une **vitesse de migration différente** et donc leur séparation progressive sur le support.

**• Exemple de la séparation des acides aminés :** ces molécules sont plus ou moins hydrophiles (polaires) ; sur un support de cellulose (adsorbant hydrophile), les acides aminés **les plus hydrophiles sont retenus**, tandis que les plus hydrophobes tendent à suivre un solvant tel que le butanol ou le phénol.
De manière pratique, une goutte d'une solution concentrée de divers acides aminés est déposée à l'extrémité d'une plaque de verre recouverte de cellulose ; celle-ci est ensuite plongée sur quelques millimètres dans un mélange aqueux de solvant qui va remonter par **capillarité**. C'est lors de cette migration du mélange eau/solvant que la séparation a lieu ; la révélation des acides aminés se fait au moyen de colorants.

• **Les colonnes échangeuses d'ions** fonctionnent sur la base de l'attraction entre les charges électriques opposées de molécules fixées et des molécules à séparer.

• **La chromatographie d'affinité** est basée sur un principe analogue. Une colonne de verre est remplie d'un support poreux sur lequel des groupements chimiques, des petites molécules ou des macromolécules **ont été greffées.** Si l'on fait passer sur cette colonne une solution dans laquelle une seule molécule a une **forte affinité** pour les molécules greffées, seule celle-ci sera spécifiquement retenue et toutes les autres traverseront la colonne et seront éliminées. C'est ainsi qu'une colonne contenant des billes portant des chaînes de poly-uracile retient uniquement les **ARNm** porteurs d'une queue de poly-adénine (poly-A), parmi tous les ARN (cf. fiche 16).

## Isolement de chloroplastes fonctionnels

Dans le cadre d'études sur la photosynthèse, vous êtes amené(e) à isoler et purifier des chloroplastes dans le meilleur état fonctionnel possible. Vous disposez du matériel biologique suivant : des feuilles d'épinard, des jeunes racines de carotte et d'une culture de cellules végétales, sous forme de cals bien verts (cf. fiche 24).

**1.** Quel matériel biologique ne pouvez-vous pas utiliser, et pourquoi ?

Vous connaissez un protocole de fractionnement cellulaire (cf. fiche 15) adapté aux cellules animales, que vous souhaitez transposer à votre matériel.

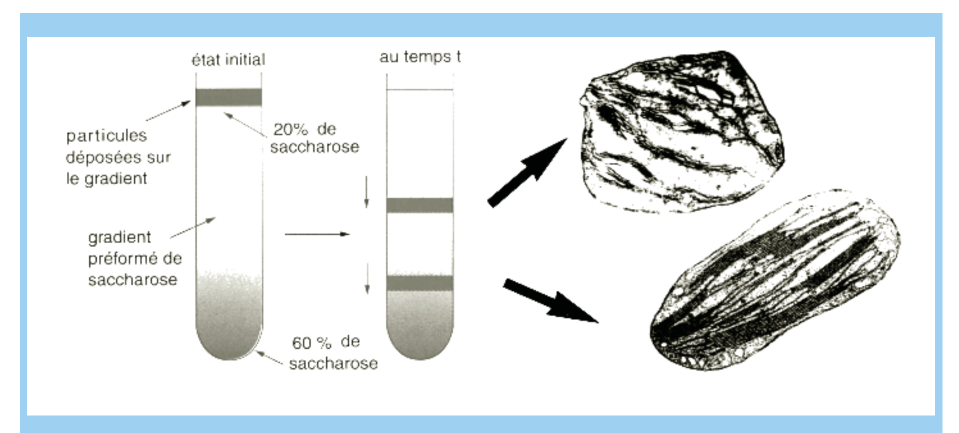
**2.** Quel est le problème rencontré avec les cellules végétales, en ce qui concerne l'étape d'homogénéisation, par comparaison avec les cellules animales ?

**3.** Comment pourriez-vous vous affranchir de ce problème dans les meilleures conditions, c'est-à-dire de façon à préserver l'intégrité des organites, et quel est alors le matériel le plus approprié pour ce traitement ?

Vous traitez vos cellules de la manière présentée dans la réponse 3). Vous avez à votre disposition un mixer destiné à broyer les cellules animales, et vous avez réalisé une solution diluée d'un détergent doux (type Triton X-100), qui dissout les lipides sans dénaturer les protéines. Vous souhaitez comparer l'efficacité de ces deux méthodes d'homogénéisation, toujours avec l'objectif d'isoler des chloroplastes aussi intacts que possible.

**4.** Quel premier test simple pouvez-vous utiliser pour vous assurer de ceci ; à quel outil plus sophistiqué devrez-vous faire appel pour vérifier ce premier résultat ?

Vous avez observé que l'homogénéisation à l'aide d'un mixer est une méthode plus reproductible que celle utilisant un détergent, mais qui conduit à une plus grande proportion de chloroplastes en mauvais état apparent. Il vous est suggéré de tenter de séparer ces deux populations d'organites par centrifugation sur un gradient continu de saccharose. Vous déposez donc votre homogénat au sommet d'un tel gradient ; le résultat observé après la centrifugation est montré dans la figure de la page suivante.




**5.** Sur quels critères se fait la séparation des particules sur un tel gradient ?
**6.** Laquelle des deux bandes de chloroplastes allez-vous récupérer pour vos expériences, et pourquoi la plus basse se situe-t-elle à cet endroit du gradient ?

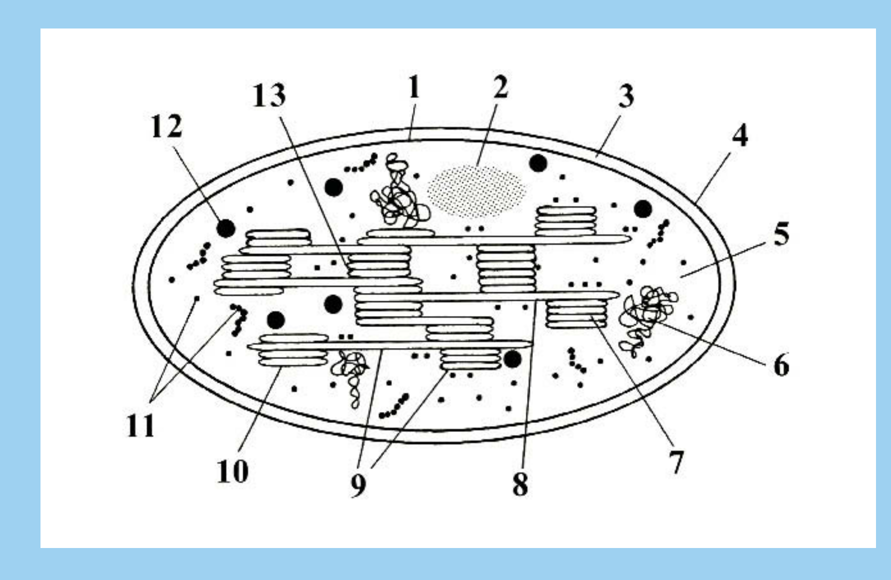
## Solution

**1.** La racine de carotte **ne réalise pas la photosynthèse**, et ses cellules n'ont pas de chloroplastes ; en revanche, elles contiennent en abondance des **chromoplastes** qui contiennent du carotène. Les feuilles d'épinard ou les cals verts peuvent être utilisés.
**2.** Le problème rencontré ici tient à la **paroi cellulosique** qui entoure chaque cellule et constitue une coque résistante, ce qui rend l'homogénéisation plus difficile.
**3.** Il est possible de **digérer la paroi** de cellules végétales vivantes au moyen d'un mélange d'enzymes extraites de divers animaux végétariens : cellulases, pectinases, hémicellulases (cf. fiche 27). Dans ces conditions, on obtient des cellules « nues » nommées **protoplastes**, qui doivent être conservées dans un milieu osmotiquement équilibré, afin qu'elles n'éclatent pas spontanément.
Le matériel le plus approprié est constitué par les **cals verts obtenus en culture**, car leurs cellules ne sont pas étroitement jointives, comme dans un tissu différencié, et leur paroi est relativement fine.
**4.** L'homogénéisation des protoplastes peut se faire au **mixer** (comme pour les cellules animales) ou avec un **détergent doux**, car la membrane plasmique de ces cellules isolées est aisément accessible et y est très sensible.
Un premier test consiste à regarder l'échantillon traité au **microscope photonique**, et à évaluer l'état des chloroplastes, en comparaison avec celui observé sur des cellules vivantes normales. Par la suite, une observation au **microscope électronique** s'impose pour s'assurer de l'intégrité maximale des organites que l'on veut purifier.
**5.** La séparation des organites sur un tel gradient est basée sur une différence de **vitesse de sédimentation**. Celle-ci est fonction de plusieurs paramètres, tels que la masse

(taille × densité), la forme, mais aussi la **densité seule**, car pour certaines particules, on peut atteindre une position de stabilité (arrêt de la migration) si la densité du milieu dans lequel elles se situent devient égale à la leur.
**6.** La bande la plus basse contient des chloroplastes visiblement en très bon état (observation au MET), alors que celle du haut contient des organites gonflés, vésiculisés, et qui semblent mal conservés. Ils sont **moins denses** que les précédents car, s'étant détériorés au cours de l'homogénéisation, ils se sont remplis du milieu (tampon dilué) dans lequel ils se trouvaient à cette étape du protocole.

## Structure des chloroplastes

Schéma de chloroplaste (observé en microscopie électronique) à légender.




## Solution

1) membrane interne
2) grain d'amidon
3) espace intermembranaire
4) membrane externe
5) stroma
6) ADN chloroplastique
7) espace intrathylakoïde
8) lamelle intergranaire
9) membranes des thylakoïdes
10) granum
11) ribosomes et polyribosomes
12) globule lipidique
13) lamelle granaire

FICHE 23

# Les fonctions des chloroplastes

## I La photosynthèse

Ce processus métabolique fondamental permet la synthèse de substances carbonées (sucres simples et polysaccharides) à partir de composés minéraux : $CO_2$ et $H_2O$, en utilisant l'énergie de la lumière solaire. Cette réaction est exactement l'inverse de celle décrite dans le métabolisme de dégradation du glucose, qui est une réaction d'oxydation spontanée et exergonique (cf. fiche 21). La photosynthèse est une réaction endergonique de réduction de l'atome de C, dont la source d'énergie physique est inépuisable : les photons. On y distingue deux étapes successives.

• **Les réactions dites lumineuses :** il s'agit de réactions catalysées au niveau des **membranes** des thylakoïdes, et qui mettent en jeu quatre gros complexes protéiques : deux **photosystèmes** qui captent la lumière grâce à leurs pigments et deux complexes qui transfèrent, l'un des **électrons**, et l'autre des **protons** de part et d'autre de la membrane. Ces derniers sont structurellement très voisins des transporteurs d'électrons et des ATP synthétases déjà vus dans les mitochondries.
Cette étape conduit à la **dissociation de l'eau**, pour en extraire des électrons, des protons et de l'$O_2$ ; elle produit du pouvoir réducteur (**NADPH**) et de l'**ATP** et ainsi convertit l'énergie lumineuse en énergie chimique,

• **Les réactions dites sombres :** ces réactions ne nécessitent pas la lumière et se déroulent en phase soluble dans le **stroma** des plastes. Elles utilisent les deux molécules produites dans la phase précédente (NADPH et ATP), qui interviennent dans le fonctionnement du **cycle de Calvin**.
La **RUBISCO** (ribulose-1,5-bis-phosphate carboxylase-oxygénase (cf. fiche 25) fixe le $CO_2$ atmosphérique chez les plantes vertes, et est donc l'enzyme-clé de la photosynthèse ; cette molécule est très abondante et peut représenter jusqu'à 20 % des protéines cellulaires solubles. Le résultat de cette phase est la production de **trioses-phosphates** qui sont soit exportés dans le cytosol, soit provisoirement stockés dans le plaste sous forme **d'amidon**.

• **Les autres fonctions métaboliques des chloroplastes :** c'est en leur sein que se réalise la réduction des nitrates et des sulfates, étape indispensable pour la synthèse des acides aminés. Le métabolisme des lipides y est aussi très intense.

## II L’identification des macromolécules séparées par électrophorèse

L’électrophorèse permet de séparer efficacement toutes les macromolécules chargées : les protéines (cf. fiche 9) et les acides nucléiques (ADN, ARN). Cependant, la seule visualisation des bandes ou des spots sur les gels d’électrophorèse, par coloration et/ou utilisation de la fluorescence, ne permet pas d’identifier une espèce moléculaire donnée parmi les centaines ou les milliers qui ont été séparées. La seule manière de reconnaître une telle molécule est d’utiliser une « sonde », c’est-à-dire une molécule marquée capable de s’associer à la cible recherchée avec une grande spécificité.

• **Nature des sondes employées :** pour les protéines, ce sont des **anticorps** marqués (qui possèdent en général des enzymes greffées faciles à visualiser), tandis que pour les acides nucléiques, il s’agit de **fragments complémentaires** d’ADN ou d’ARN capables de s’hybrider avec eux. Ces derniers sont alors radioactifs et détectables par autoradiographie, ou bien porteurs de groupements chimiques susceptibles d’être reconnus par des anticorps, comme pour les protéines. Ces techniques de détection sont décrites en détail dans les fiches traitant de l’**immunodétection** (cf. fiche 7) et de **l’hybridation *in situ*** (cf. fiche 12), transposées à la Biologie Moléculaire.

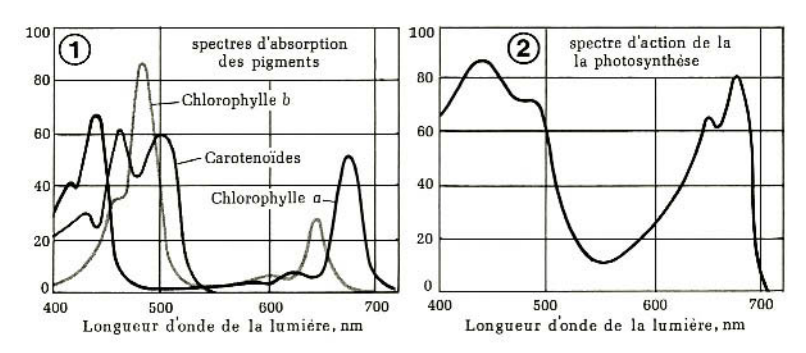
• **Le transfert :** dans tous les cas, la première étape consiste à faire passer les molécules contenues dans le gel sur un **support souple et résistant** ; en effet, les gels sont souvent fragiles, cassants ou très mous, et donc difficilement manipulables. Cette étape de transfert (« blotting » en anglais), se réalise en déposant sur le gel une feuille fonctionnant comme un filtre, faite de nitrocellulose ou de nylon.

Le passage des molécules du gel vers la feuille posée dessus se fait par **capillarité**, grâce au flux d’une solution tampon, ou à l’aide d’un **courant électrique** : électrotransfert. On obtient donc une **réplique** du gel sur laquelle les molécules séparées ont la même disposition, mais plus concentrées et plus accessibles à des sondes de toutes natures, car en surface.

• **La détection des sondes :** la seconde étape consiste à mettre le filtre en contact avec une solution de la sonde marquée : anticorps pour les protéines, sonde nucléique pour l’ADN ou l’ARN. Après un temps **d’incubation** suffisant pour que la sonde se soit fixée sur sa cible, et après divers lavages pour éliminer l’excédent non fixé de celle-ci, la phase de **révélation** a lieu (film autoradiographique, ou mise en présence d’un substrat de l’enzyme greffée à l’anticorps, donnant ensuite un produit coloré). Selon les molécules étudiées, le protocole se nomme : « **Southern blot** » pour l’ADN, « **northern blot** » pour l’ARN et « **western blot** » pour les protéines.

### Spectres d'absorption et spectre d'action photochimique

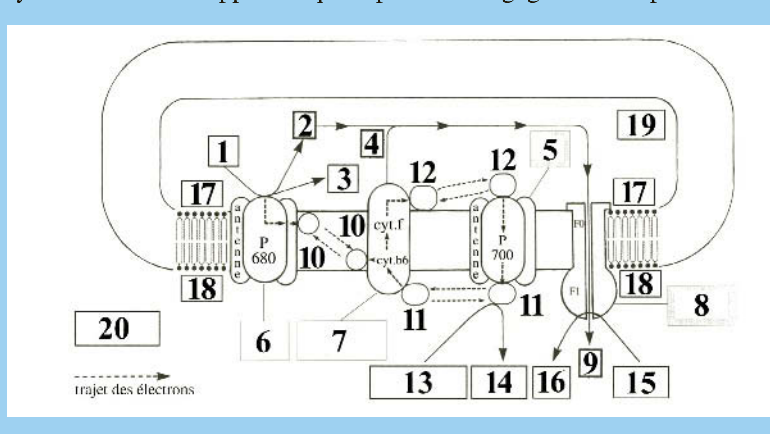
Les **spectres d'absorption** (cf. fiche 21) des différents pigments photosynthétiques d'un végétal vert sont présentés dans le diagramme 1. Le **spectre d'action photochimique** consiste à mesurer le dégagement d'$O_2$ obtenu lors de la photosynthèse pour chaque longueur d'onde de la lumière visible (diagramme 2).




On observe une excellente superposition entre la somme des spectres d'absorption et le spectre d'action. Ceci montre que les pigments qui captent la lumière sont principalement les chlorophylles, mais que les pigments accessoires participent activement à la photosynthèse en transférant l'énergie captée aux photosystèmes.

## Organisation de la membrane des thylakoïdes

Légender et compléter ce schéma représentant l'organisation de la membrane d'un sac thylakoïdien. Développer chaque réponse en dégageant les aspects fonctionnels.



## Solution

**1.** Molécule d'**eau** ($H_2O$) servant de donneur d'électrons pour le **photosystème II**.
**2. Proton** ($H^+$), issu de la dissociation de l'**eau** au niveau du **photosystème II**.
**3.** Molécule de **$O_2$** provenant de la dissociation de l'**eau**.
**4. Proton** pompé dans le stroma par le **complexe protéique dit « b6/f »** (contenant divers cytochromes), et envoyé vers la cavité du thylakoïde.
**5. Photosystème I** (dit P 700), comportant une **antenne** et un centre **réactionnel**.
**6. Photosystème II** (dit P 680), de structure voisine de celle du P 700.
**7. Complexe transporteur d'électrons**, dit **« cyt b6/f »**, qui reçoit des électrons de la plastoquinone ou de la ferredoxine, et les cède à la plastocyanine. Il agit comme **pompe à protons**, à la manière du complexe dit « cyt b/c1 » des mitochondries.
**8.** Complexe **ATP synthétase**, identique à celui trouvé dans les mitochondries. C'est à son niveau (tête globulaire f1) que se réalise la phosphorylation de l'ADP en **ATP**.
**9. Proton** regagnant le stroma à travers l'ATP synthétase ; son mouvement spontané dans le sens de son gradient électrochimique entraîne la phosphorylation de l'ADP.
**10. Coenzyme** transporteur d'hydrogène ($H^+$ et électron), nommé **plastoquinone**. C'est une petite molécule hydrophobe très voisine du coenzyme Q (ubiquinone), et qui fonctionne de la même façon dans la membrane interne des mitochondries.
**11. Ferredoxine** : petite protéine stromatique qui contient un centre « fer/soufre » et fonctionne comme un **couple red-ox**. Elle est capable : a) de céder des électrons pour réduire le $NADP^+$ en NADPH, ou : b) de les céder au complexe « cyt b6/f ».
**12. Plastocyanine** : petite protéine de la lumière des thylakoïdes, contenant du cuivre et fonctionnant comme la ferredoxine. Elle transporte des électrons entre le complexe « cyt b6/f » (donneur) et le photosystème II (accepteur).
**13. $NADP^+$** + $H^+$ : la forme oxydée du **coenzyme** capte un proton du stroma et deux électrons provenant du photosystème II pour donner du NADPH.
**14. NADPH** : pouvoir réducteur qui sera utilisé dans le cycle de Calvin.
**15. ADP + P**.
**16. ATP**, issu de la phosphorylation de l'ADP au niveau de l'ATP synthétase.
**17. Face membranaire chargée positivement** : la lumière du thylakoïde est plus acide que le stroma.
**18. Face membranaire chargée négativement**. Le gradient électrochimique ainsi créé entre les deux faces de la membrane « attire » les protons vers le stroma.
**19. Cavité du sac** thylakoïdien.
**20. Stroma** du chloroplaste.

# Les étapes de la réduction du $CO_2$

Les propositions suivantes concernent la phase dite « sombre » de la photosynthèse. Répondre par vrai ou faux.

**1.** La molécule acceptrice du $CO_2$ comporte deux atomes de carbone, de sorte qu'on obtient en une seule réaction enzymatique un composé à trois atomes de carbone.

**2.** Une partie de l'ATP fabriqué pendant la phase lumineuse permet de phosphoryler le premier produit obtenu par la fixation du $CO_2$ : le 3-phosphoglycérate.

**3.** Le cycle de Calvin permet de régénérer 3 molécules de ribulose-1,5-bisphosphate à partir de 5 molécules de trioses, alors qu'un seul triose est produit, de façon nette.

**4.** Tout l'ATP produit dans le chloroplaste est consommé dans le stroma, et n'est pas exporté dans le cytosol, à la différence des mitochondries.

**5.** La photosynthèse en C4 est ainsi nommée car elle a une efficacité 4 fois supérieure à celle décrite chez les plantes dites en C3.

**6.** La concentration actuelle du $CO_2$ atmosphérique (0,03 %) n'est pas un facteur limitant pour la photosynthèse chez la plupart des végétaux.

**7.** La RUBISCO est la protéine la plus abondante dans la biosphère.

## Solution

**1. Faux** : la molécule qui fixe le $CO_2$ est un pentose, le ribulose-1,5-bisphosphate, et c'est la RUBISCO qui catalyse cette réaction.

**2. Vrai** : le phosphoglycérate est phosphorylé en bis-phosphoglycérate, composé instable qui est ensuite réduit par le NADPH en phosphoglycéraldéhyde (un triose).

**3. Vrai** : trois molécules de ribulose-1,5-bisphosphate fixent 3 molécules de $CO_2$ qui représentent le bilan net de cette opération, sous la forme d'une molécule de phosphoglycéraldéhyde.

4. **Vrai** : il n'y a pas d'exportation d'ATP vers le cytosol (car pas de transporteur).

**5. Faux** : elle doit son nom à la première molécule formée après fixation du $CO_2$, à savoir une molécule en C4 : l'oxaloacétate, issu du phosphoénolpyruvate (C3).

**6. Faux** : plus cette concentration est élevée, et plus l'intensité de la photosynthèse est importante pour une intensité lumineuse donnée.

**7. Vrai** : cette molécule peut représenter une proportion très importante (50 %) des protéines des tissus végétaux verts, d'où cette affirmation.

FICHE 24

# Les peroxysomes et organites apparentés

## I Des organites très divers à fonction oxydative

À côté des mitochondries et des plastes, qui ont typiquement une activité de conversion de l'énergie, il existe chez les Eucaryotes plusieurs catégories d'organites impliqués dans des réactions d'oxydoréduction, mais ne produisant pas d'ATP. Les plus connus sont les peroxysomes et les glyoxysomes, mais il existe chez les Protistes plusieurs organites spécifiques, dont les activités sont très originales.

• **Les peroxysomes des cellules animales :** ces petits organites unimembranaires (0,5-1 µm) et universels sont très abondants dans les cellules de certains organes tels que le foie et les reins des Mammifères. Malgré une certaine uniformité de structure, leur diversité biochimique est grande, mais leur matrice contient toujours deux types d'enzymes oxydatives : des **flavoprotéines** à FAD ou FMN, et des **peroxydases** (la catalase).
Les premières consomment de l'$O_2$ et oxydent divers substrats (le plus souvent des acides organiques) en produisant $H_2O_2$ ; les secondes utilisent ce dernier composé pour oxyder à leur tour d'autres molécules. Les cascades de réactions ainsi obtenues ont une fonction générale de **dégradation** et de **détoxification** dans les cellules.

• **Les peroxysomes des cellules végétales et les glyoxysomes :** leur équipement enzymatique est plus diversifié que celui des peroxysomes des cellules animales. Ils interviennent de façon active dans le processus de **photorespiration**, qui consomme de l'$O_2$ et implique également les chloroplastes et les mitochondries.
Les **glyoxysomes** sont des peroxysomes spécialisés, très abondants dans les cellules des graines oléagineuses en germination ; ils y assurent la **dégradation les acides gras** des lipides en succinate qui, avec l'aide des mitochondries et des enzymes de la glycolyse, permettra de produire du glucose utilisable par les cellules en croissance.

**• Les glycosomes de certains Protistes :** ces organites unimembranaires possèdent dans leur lumière toutes les enzymes de la glycolyse ; ils sont typiques des parasites responsables de la maladie du sommeil de l'Homme, les Trypanosomes.

**• Les hydrogénosomes :** ces petits organites à double membrane (1 µm) apparentés aux mitochondries ne possèdent généralement pas de génome propre. On les rencontre chez certains Protistes parasites anaérobies tels que les *Trichomonas* ; ils sont caractérisés par leur aptitude à produire de l'$H_2$, du $CO_2$, mais aussi de l'ATP.

# II Les cultures de bactéries, de cellules végétales et de champignons

De même que pour les cellules animales (cf. fiche 14), il est important de pouvoir disposer de cultures de cellules de nombreux autres organismes. Ces cultures étant homogènes au plan génétique et plan physiologique, elles sont indispensables pour l'étude de tout problème biologique. Les premières cultures clonales ont été des cultures bactériennes (XIX^e siècle), car elles sont les plus faciles à réaliser.

**• Les cultures bactériennes :** lorsqu'un inoculum très dilué est étalé stérilement sur une boîte de **milieu nutritif solide** (gélosé, en boîte de Petri), les bactéries sont très éloignées les unes des autres au départ, et elles donnent, après de nombreux cycles de division binaire, des **colonies homogènes** (ou des clones, pour simplifier, issus d'une seule cellule) bien séparées, visibles à l'œil nu (cf. fiche 1). Lorsque cet inoculum contient initialement différentes espèces bactériennes en mélange, cette méthode permet d'isoler des colonies de « souches » pures (on parle de **sous-clonage**).
Il est ensuite possible d'utiliser de telles populations pures pour inoculer des milieux **nutritifs liquides** (en Erlen-Meyer, ou en fermenteurs), dont les volumes parfois élevés permettent d'obtenir des quantités de cellules identiques très importantes ; les cellules en suspension sont séparées du milieu par une simple centrifugation.

**• Les milieux nutritifs de culture bactériens :** ils se répartissent en deux catégories
- 1) les *milieux synthétiques*, dont la composition, souvent simple, est parfaitement connue et contrôlée (sels minéraux, sucres et quelques vitamines),
- 2) les *milieux naturels*, très riches, dérivés d'extraits biologiques bruts (extraits de viande, de plantes, de levure), dont la composition est complexe et mal connue.
Les premiers sont souvent spécifiques d'une espèce donnée, dont les exigences nutritionnelles sont bien précises, tandis que les seconds permettent la croissance de nombreuses **espèces hétérotrophes** différentes. Pour se multiplier, les Procaryotes photosynthétiques nécessitent évidemment de la lumière, en plus des sels minéraux.

**• La culture des cellules végétales :** elles se multiplient *in vitro*, sur milieu gélosé nutritif, à l'état de massifs cellulaires plus ou moins compacts, appelés **cals**. On peut

également cultiver ces cellules en suspension dans un milieu liquide ; dans ce cas, il s'agit le plus souvent d'agrégats de cellules plutôt que des cellules isolées.

• **La culture des Champignons :** il s'agit en général ici de faire se développer un microorganisme hétérotrophe multicellulaire et filamenteux ; les cultures sur milieu solide ou milieu liquide, synthétique ou riche, sont possibles. La levure de bière, champignon unicellulaire, se cultive exactement de la même façon que les bactéries.

## Fonctions des peroxysomes

Ces organites mal connus remplissent des fonctions métaboliques insoupçonnées et souvent très importantes chez les Animaux. Les propositions suivantes illustrent quelques-unes de ces fonctions ; répondre par Vrai ou Faux.
**1.** Ils sont le lieu de la synthèse du cholestérol, dans le foie des Mammifères.
**2.** L'oxydation des acides gras à très courte chaîne, que les mitochondries ne peuvent pas réaliser, se déroule uniquement dans les peroxysomes.
**3.** La production de lumière chez les lucioles (vers luisants) met en jeu une série de réactions ayant lieu dans les peroxysomes.
**4.** On ne connaît aucune maladie génétique humaine liée à une déficience en protéines peroxysomales, en raison du caractère fortement létal de ces anomalies.
**5.** L'oxydation de l'alcool en acétaldéhyde dans le foie a lieu dans les peroxysomes.

## Solution

**1. Vrai** : le cholestérol et le dolichol sont synthétisés aussi bien dans le RE que dans les peroxysomes des hépatocytes ; ces derniers fabriquent aussi les sels biliaires.
**2. Faux** : les acides gras à très longue chaîne (> 20 atomes de C) sont uniquement métabolisés dans les peroxysomes ; l'acétyl-coA ainsi produit passe dans le cytosol.
**3. Vrai** : cette réaction met en jeu un substrat pouvant émettre des photons : la luciférine, et une enzyme : la luciférase, qui est une enzyme peroxysomale.
**4. Faux** : on en connaît actuellement 17, autosomales ou liées à l'X, qui se traduisent par des atteintes du système nerveux conduisant plus ou moins rapidement à la mort.
**5. Vrai** : environ 25 % de l'alcool consommé est ainsi dégradé dans le foie.

## Biogenèse des peroxysomes

La croissance des peroxysomes s'effectue grâce à l'apport constant de protéines de membrane et de protéines de matrice ; celles-ci sont codées dans le noyau et synthétisées sur des ribosomes cytosoliques, puis intégrées à ces organites de façon post-traductionnelle (comme pour les mitochondries et les plastes ; cf. fiche 25).

On se propose d'analyser les mécanismes de l'importation de deux protéines vers la lumière des peroxysomes : la catalase et la thiolase.

Les expériences suivantes ont été réalisées :

1) ces deux protéines sont purifiées à partir d'une fraction cytosolique isolée, par fractionnement cellulaire, après homogénéisation de cellules de foie de rat. Elles sont ensuite marquées radioactivement par une technique qui ne les dénature pas ;

2) une fraction de peroxysomes purifiés, issus de ces mêmes cellules, est également obtenue après fractionnement cellulaire ;

3) les deux protéines radiomarquées sont ensuite mises en présence de peroxysomes purifiés pendant 15 min, *in vitro,* dans un milieu réactionnel approprié.

**1.** Quelles techniques utiliseriez-vous pour vérifier si ces 2 protéines sont entrées ou non dans les peroxysomes, au bout des 15 min d'incubation ?

**2.** Comment pouvez-vous vous assurer que les protéines sont bien entrées dans la lumière des microsomes, et qu'elles ne sont pas seulement collées à leur surface ?

4) quatre conditions expérimentales différentes sont comparées, selon que l'on ajoute ou pas au milieu réactionnel un certain volume de fraction cytosolique (FCS), ou bien un peu d'ATP. L'efficacité relative de l'entrée des protéines est exprimée en % ; on obtient des résultats très voisins pour les deux protéines :

| | - FCS<br>+ ATP | - FCS<br>- ATP | + FCS<br>+ ATP | + FCS<br>- ATP |
|---|---|---|---|---|
| Efficacité : | 0 | 0 | 100 | 15 |

**3.** Quelle conclusion tirez-vous de ces expériences, et quelles hypothèses formulez-vous au sujet des mécanismes d'importation mis en jeu ?

5) un lot de peroxysomes purifiés est soumis à l'action d'une protéase diluée pendant un temps bref ; ces organites sont ensuite mis en présence de chacune des deux protéines marquées, en présence de FCS et d'ATP, comme précédemment. On observe que les protéines sont alors incapables de pénétrer dans les peroxysomes.

**4.** Quel est le résultat attendu de l'action de la protéase, et quelle nouvelle hypothèse pouvez-vous formuler concernant les mécanismes mis en jeu ?

6) grâce aux techniques du génie génétique (cf. fiche 26), il est possible d'obtenir des formes tronquées de ces deux protéines, c'est-à-dire amputées d'une dizaine d'acides aminés, soit du côté N-terminal, soit du côté C-terminal. Ces 4 protéines sont ensuite radiomarquées et utilisées dans des expériences identiques à celles où on a ajouté au milieu des extraits cytosoliques (FCS) et de l'ATP.

Enfin, l'efficacité de l'entrée *in vitro* des protéines dans les organites a été mesurée :

| | catalase<br>tronquée en N | catalase<br>tronquée en C | thiolase<br>tronquée en N | thiolase<br>tronquée en C |
|---|---|---|---|---|
| Efficacité : | 100 | 0 | 0 | 100 |




**5.** Quelles informations apportent ces nouvelles expériences ?
**6.** Présenter un modèle résumant l'ensemble des hypothèses formulées.

## Solution

**1.** Il faut d'abord **centrifuger** le contenu du tube à essais, de façon à récupérer à nouveau les peroxysomes sous forme d'un culot (sédiment). Ensuite, il faut **mesurer la radioactivité du culot** ; si ce dernier est radioactif, on peut imaginer que des protéines radioactives ont pénétré dans les organites (on parle de cosédimentation).
**2.** Pour s'assurer que les protéines sont bien dans la lumière, on peut soumettre les peroxysomes à un **traitement protéolytique** (avec de la trypsine). En effet, si les protéines sont collées dessus, elles seront accesssibles à l'enzyme, et seront digérées.
**3.** Ces expériences montrent qu'il faut absolument ajouter des protéines cytosoliques pour que la pénétration de la catalase et de la thiolase ait lieu. De plus, on observe que l'**ATP** a un **rôle important** à jouer dans ce processus, qui est sans doute actif.
On en conclut que des **protéines cytosoliques** doivent interagir avec les protéines à importer pour que le système fonctionne. On peut faire l'hypothèse que ces protéines cytosoliques mises en évidence agissent comme des **récepteurs solubles** intervenant comme intermédiaires. Le petit volume de FCS ajouté dans la 4$^{e}$ expérience a apporté un peu d'ATP, responsable de la faible valeur observée : 15.
**4.** La protéase agit en **dégradant la partie superficielle** des protéines intrinsèques appartenant à la membrane des peroxysomes. Le résultat montre que de telles protéines sont indispensables au bon fonctionnement du système d'importation. On sait que les **récepteurs membranaires** appartiennent à cette catégorie de protéines.
**5.** Ces expériences montrent que des **segments N ou C-terminaux** des protéines à importer sont indispensables pour que le processus puisse avoir lieu ; ce sont des séquences-signal, localisées ici en C-ter pour la catalase, et en N-ter pour la thiolase.
**6.** Ce système met en œuvre trois acteurs classiques importants : une **séquence-signal** de la protéine à importer, un **récepteur soluble** cytosolique qui la reconnaît, et un **récepteur membranaire**, qui reconnaît ce dernier, et permettra l'importation ; voir aussi à ce sujet les fiches 25 et 26.

FICHE 25

# La biogenèse des mitochondries et des plastes

## I Une information génétique réduite

L'information génétique de ces organites, que l'on qualifie de semi-autonomes, est très restreinte par rapport au nombre total de polypeptides qui les constituent. L'essentiel de ces protéines, à savoir plus de 95 % en nombre et en masse, est en fait codé par des gènes nucléaires, synthétisé sur les ribosomes cytosoliques et enfin importé dans les organites par des mécanismes spécifiques d'adressage.

• **La synthèse endogène des protéines :** le matériel génétique des **mitochondries** des cellules animales est formé d'une petite molécule d'ADN circulaire de $16 \cdot 10^3$ paires de bases, codant pour un très faible nombre de polypeptides (voir l'exercice suivant). Ces derniers participent à la formation des complexes protéiques de la membrane interne : transporteurs d'électrons et ATP synthétase (cf. fiche 21).
Le génome circulaire des **chloroplastes** des cellules végétales est bien plus long : en moyenne $160 \cdot 10^3$ paires de bases, et il contient environ 100 gènes codant pour des ARNr, des ARNt, ainsi qu'une soixantaine de polypeptides intervenant dans la transcription, la traduction et la photosynthèse. L'exemple le plus classique est celui de l'enzyme nommée **RUBISCO** (552 kDa ; cf. fiche 23).
On a montré en effet que cette molécule est constituée de deux polypeptides de masse moléculaire 55 et 14 kDa, présents en quantités équimoléculaires (8 copies de chacun d'eux), dont l'un est codé par le **génome nucléaire**, et l'autre par le **génome chloroplastique**. Les deux s'assemblent dans l'organite ; voir l'exercice suivant.

• **L'importation des protéines fabriquées dans le cytosol :** elle nécessite tout d'abord la présence de **séquences-signal**, simples ou composites, toujours situées à l'extrémité N des protéines. Celles-ci sont fabriquées sur les ribosomes libres du cytosol, puis adressées **de façon post-traductionnelle** vers les mitochondries ou les chloroplastes, de façon très spécifique.
La machinerie d'importation vers ces organites est complexe : elle comprend des **récepteurs** membranaires reconnaissant les protéines à importer, des **tunnels** qui per-

mettent le franchissement des deux membranes, et une **source d'énergie** : l'ATP. Il existe différents mécanismes, selon le compartiment destinataire dans l'organite.

# II L'étude des processus d'adressage

La question de l'adressage des protéines vers leur compartiment destinataire a été posée dès le début des années 1960, lorsque la voie de sécrétion a commencé à être analysée. Diverses techniques ont été développées pour décrire cette voie et étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents. Les expériences anciennes de pulse-chasse ont ainsi permis de localiser, grâce aux techniques cytologiques associées à l'autoradiographie, leur lieu de synthèse et leur trajet intracellulaire (cf. fiche 18).

• **Les apports de la Biochimie :** les mécanismes moléculaires de l'adressage vers le RE ont été découverts peu après (1975), mais avec des outils très différents. L'addition de microsomes rugueux à des systèmes de traduction *in vitro* classiques (cf. fiches 16 et 17) a conduit à démontrer l'intervention d'une **séquence-signal** N-terminale hydrophobe, clivée dès l'entrée de la protéine dans la cavité du RE, ainsi que le phénomène **d'insertion cotraductionnelle**.
Pour mettre en évidence la pénétration du polypeptide, il a été nécessaire d'utiliser des protéases et des détergents ; ces méthodes ont aussi été employées pour étudier l'adressage vers les divers compartiments des **mitochondries et les plastes**.

• **L'injection de protéines :** cette approche a été développée au début des années 1980 pour étudier l'adressage protéique vers le noyau. Une protéine spécifiquement nucléaire : la **nucléoplasmine**, a été purifiée et rendue radioactive ; son injection dans le cytoplasme de cellules géantes (œufs d'amphibien) a ensuite été effectuée au moyen de micro-aiguilles (cf. fiche 26).
L'**autoradiographie** a enfin permis de visualiser l'entrée de la protéine dans cet organite et d'analyser les paramètres conditionnant ce phénomène. Une conclusion importante a été que le transport vers le noyau nécessitait de l'énergie (transport actif) et la présence d'une **séquence-signal nucléaire** appropriée.

• **Les apports de la génétique et de l'immunofluorescence :** ces outils performants ont été mis en œuvre dans la suite des études sur l'adressage nucléaire. Des **mutants** de virus, dont une partie du cycle de reproduction implique des protéines spécifiques transitant par le noyau (pour la réplication de l'ADN ; cf. fiche 30), ont été utilisés ; les mouvements de ces protéines ont ainsi pu être suivis au cours du cycle grâce à des **anticorps spécifiques**.
L'identification des mutations et la localisation au niveau protéique des altérations associées ont ensuite conduit à la construction de **plasmides recombinés** portant des séquences-signal putatives associées à des **protéines-reporter** (cf. fiche 18). Ces expé-

riences ont permis, en 1984, de définir génétiquement la première séquence-signal précise pour l'adressage d'une protéine vers le noyau.

## Biogenèse des mitochondries

L'ADN mitochondrial des cellules animales est une molécule circulaire fermée dont la longueur est de 5,5 µm environ. Cet ADN code pour un certain nombre d'ARN qui, à l'image de ce qui se passe pour les ARN nucléaires, se répartissent en trois catégories : ARNr, ARNt et ARNm. Le séquençage de cet ADN a montré qu'il contient deux gènes d'ARNr (950 et 1600 nucléotides de long) et 22 ARNt (65 nucléotides environ chacun) ; chacun de ces gènes n'existe qu'en une seule copie.
**1.** Sachant que 10 paires de nucléotides (nt) représentent une longueur de 3,4 nm, calculer le nombre maximum de polypeptides susceptibles d'être codés par cet ADN (nombre d'acides aminés d'une chaîne polypeptidique moyenne : 300).
Grâce à des expériences d'inhibition spécifique de l'activité des ribosomes du cytosol (voir l'exercice suivant), on montre par électrophorèse que seulement 13 polypeptides sont synthétisés dans les mitochondries, sur leurs propres ribosomes.
**2.** Que peut-on conclure au sujet de l'organisation des gènes mitochondriaux ?
L'électrophorèse bidimensionnelle de l'ensemble des protéines mitochondriales fait apparaître près de 400 chaînes polypeptidiques différentes.
**3.** Commentez cette observation, en tenant compte des résultats précédents.

## Solution

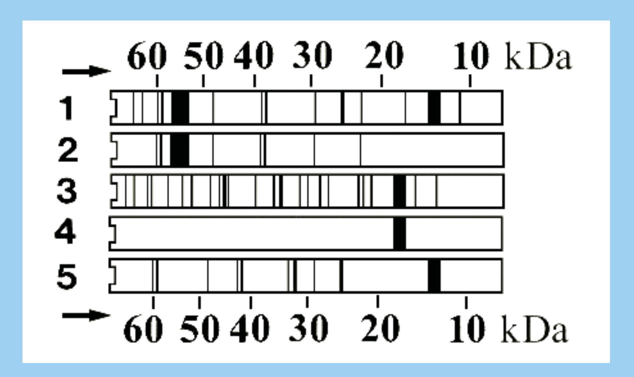
**1.** La longueur de l'ADN est de 5 500 nm ; si une paire de nt représente 0,34 nm, cet ADN possède donc **16 176** paires de nt (5 500/0,34). Le nombre de paires de nt « utilisés » par les ARN connus dans l'ADN = 950 + 1 600 + (22 × 65) = **3 980**. Le reste des nt susceptibles de coder pour des protéines = 16 176 – 3 980 = **12 196**. Un acide aminé étant codé par 3 nt (un codon), le nombre total maximum de codons est de **4 065** (12 196/3). Si tout l'ADN est codant, et avec 300 codons pour une chaîne polypeptidique, cela représente donc en théorie **13,5 chaînes** au maximum.
**2.** L'expérience montre que **13 chaînes** sont codées, ce qui prouve bien que toutes les séquences codantes sont strictement jointives et non interrompues par des séquences non codantes. On en conclut que le génome mitochondrial, comme celui des bactéries et des virus, est **extrêmement compact.**
Cette situation est donc très différente de ce qu'on connaît pour les **gènes nucléaires de protéines**, qui contiennent des introns et des séquences non traduites en amont et en aval du cadre de lecture de la traduction. Ces gènes sont en outre séparés par de très longues séquences dépourvues de sens.




**3.** Si seulement 13 protéines sont fabriquées à partir du génome des mitochondries, cela signifie que l'énorme majorité des protéines de ces organites est codée par des gènes nucléaires, fabriquée dans le cytosol et enfin importée dans ces organites.

## Synthèse de la RUBISCO

Les expériences suivantes sont destinées à montrer la complexité de la biosynthèse et de l'assemblage de la RUBISCO au sein des chloroplastes.
Elles ont été conduites chez un Protiste photosynthétique, l'Euglène :
1) 3 cultures d'Euglènes sont conduites en présence d'un acide aminé radioactif : la leucine $^{3}$H, dans 3 conditions différentes : a) l'acide aminé radiomarqué seul ; b) présence, en plus de cet acide aminé dans le milieu, d'un antibiotique qui inhibe spécifiquement le fonctionnement des ribosomes chez les bactéries ; c) présence, en plus de cet acide aminé dans le milieu, d'un antibiotique bloquant spécifiquement la synthèse protéique réalisée sur les ribosomes cytosoliques des Eucaryotes.
2) après 30 min d'incubation, les protéines sont extraites de façon quantitative des cellules, mises en présence d'un anticorps anti-RUBISCO, et la radioactivité du complexe immun purifié (obtenu par immuno-précipitation) est alors mesurée.
On obtient respectivement les valeurs suivantes, exprimées en % : 100, 3 et 4.
**1.** Quelle conclusion tirez-vous de cette observation et quelles hypothèses pouvez-vous formuler concernant la synthèse de la RUBISCO ?
Un lot d'Euglènes est homogénéisé dans des conditions telles que les chloroplastes que l'on purifie après centrifugation (cf. fiche 15) sont parfaitement intacts, d'après l'observation en microscopie électronique. Ces derniers sont ensuite incubés pendant 30 min en présence de leucine $^{3}$H. Après cela, on réalise l'électrophorèse de leurs protéines en présence de SDS (canal 1), puis une autoradiographie à partir du gel obtenu (canal 2) ; les résultats sont donnés dans la figure suivante :



**2.** Pourquoi certains polypeptides sont-ils visualisés par cette autoradiographie, et d'autres pas ? Cette expérience permet-elle de préciser l'hypothèse formulée en 1 ?
Les ARNm cytosoliques sont extraits à partir d'un nouveau lot d'Euglènes et utilisés dans une expérience de traduction *in vitro* (cf. fiche 16). Les produits de traduction sont ensuite analysés par électrophorèse en SDS et par autoradiographie (canal 3).
Grâce à l'anticorps anti-RUBISCO, un immuno-précipité est obtenu à partir de ces produits de traduction, et analysé dans les mêmes conditions que précédemment, à savoir électrophorèse en SDS puis autoradiographie (canal 4).
**3.** Dans quel territoire cellulaire les protéines du canal 3 sont-elles synthétisées ?
**4.** Quelle hypothèse formulez-vous au sujet du polypeptide détecté dans le canal 4 ?
Les produits de traduction *in vitro* radioactifs sont enfin mis en présence de chloroplastes purifiés et intacts pendant 15 min, puis les protéines de ces derniers sont analysées par autoradiographie après électrophorèse en SDS (canal 5).
**5.** Quelle est la nature du polypeptide le plus abondant observé dans le canal 5 et pourquoi sa taille n'est-elle pas exactement celle observée dans le canal 4 ?

## Solution

**1.** En présence des deux antibiotiques, il n'y a pratiquement pas de RUBISCO marquée ; ceci suggère que **l'activité simultanée** de deux types de ribosomes dans la cellule est nécessaire pour sa synthèse. Il a été montré que les ribosomes des chloroplastes sont sensibles à l'antibiotique antibactérien (ici le chloramphénicol).
**2.** Le canal 1 montre **l'ensemble** des protéines contenues dans les plastes ; on y note la présence de deux polypeptides abondants de 55 et 14 kDa, qui sont sans doute ceux constituant la RUBISCO. Le canal 2 montre seulement les polypeptides qui sont devenus **radioactifs** au cours de l'incubation des chloroplastres, c'est-à-dire ceux qui ont été synthétisés au sein même des organites ; seul celui de 55 kDa est radioactif. On déduit de ceci qu'il existe une **synthèse endogène** de protéines chloroplastiques, produisant en particulier une chaîne très abondante, dont la taille est de 55 kDa.
**3.** Elles sont fabriquées grâce aux ribosomes présents dans le **cytosol** des cellules, à partir des ARNm cytosoliques.
**4.** Ce petit polypeptide de 18 kDa que l'anticorps reconnaît, est **nécessairement apparenté** à la molécule de 14 kDa qui fait partie de la RUBISCO.
**5.** Des polypeptides sont entrés dans les plastes ; en particulier, on y trouve la chaîne de 14 kDa, qui est la **petite sous-unité** de la RUBISCO. La différence de taille avec la chaîne de 18 kDa observée plus haut tient à la disparition de la **séquence-signal** d'adressage (4 kDa), qui est coupée après l'entrée de la protéine dans l'organite. On rappelle que ce phénomène a aussi lieu lors de l'adressage vers le mitochondries et le RER (cf. fiche 16).

# L'adressage des protéines vers le noyau

## I Les échanges nucléo-cytoplasmiques

Le noyau, qui est le plus gros de tous les organites, est le lieu d'une intense activité métabolique concernant les acides nucléiques : il s'agit de la réplication de l'ADN pendant la phase S, et de la transcription, pendant la durée de l'interphase ; on rappelle que la réparation de l'ADN a également lieu pendant toute cette période (cf. fiches 10 et 11). Ces activités impliquent des échanges constants de métabolites et de protéines, dans les deux sens, à travers l'enveloppe nucléaire.

**• La problématique de l'adressage des protéines nucléaires :** un grand nombre de protéines fabriquées dans le cytosol doivent être **importées dans le noyau**, en permanence ou de façon localisée dans le temps : protéines de structure (histones), enzymes (ADN et ARN polymérases), protéines régulatrices (facteurs de transcription), tandis que d'autres doivent être exportées, le plus souvent en association avec des ARN (sous-unités ribosomiques, particules RNP diverses).
Ces molécules franchissent l'enveloppe nucléaire, dont la particularité est de disparaître lors de la division cellulaire, conduisant au **mélange transitoire** du cytosol et du nucléoplasme. Après chaque division, la cellule doit donc réimporter très rapidement et de façon spécifique toutes ces protéines qui ont quitté le noyau.

**• Les complexes des pores nucléaires :** ces structures de grande taille (120 nm de diamètre) sont ancrées dans la lamina nucléaire et sont formées de près de 100 protéines distinctes. Elles ont une **symétrie d'ordre 8** et leur organisation complexe est très différente selon qu'on examine la face cytosolique ou la face interne du noyau. Il en existe plusieurs milliers dans un noyau de cellule banale. On a montré qu'ils laissent rentrer passivement (par **diffusion**) des molécules de masse inférieure à 60 kDa, ce qui correspond à un diamètre efficace voisin de 9-10 nm.

**• Les séquences-signal nucléaires :** toutes les protéines importées dans le noyau sont munies d'une courte séquence-signal, localisée en une **région quelconque** de la molé-

cule, mais qui doit affleurer à sa surface pour être reconnue. Elle comporte en général plusieurs acides aminés basiques encadrant une ou deux prolines. Simple ou composite, **elle ne fait pas l'objet d'un clivage** après importation, comme c'est le cas pour toutes les autres séquences-signal (cf. fiches 16 et 24).

**• La machinerie d'adressage :** il existe deux types de récepteurs impliqués dans le processus d'adressage : des **récepteurs solubles** cytosoliques (appelés importines), qui reconnaissent la molécule à importer *via* sa séquence-signal, et des **récepteurs fixes** localisés sur les complexes des pores. Comme pour tout transport, une source d'énergie est indispensable, sous la forme de molécules d'ATP et de GTP.

# II La transformation génétique des cellules et des organismes

La transformation génétique (ou transgénèse) des cellules en culture, bactériennes, animales ou végétales est un outil très répandu en recherche fondamentale, pour comprendre le fonctionnement des gènes et analyser les processus cellulaires.

**• Les principales étapes du clonage de l'ADN :** la première étape consiste à découper de façon reproductible l'ADN extrait d'un organisme en fragments de taille plus ou moins grande, au moyen d'enzymes appropriées (les enzymes de restriction). Après purification, et grâce à la **technologie de recombinaison de l'ADN**, ces fragments sont intégrés dans des plasmides, molécules capables d'autoréplication dans des cellules-hôtes bactériennes ou eucaryotiques, et servant de vecteurs.
Ces plasmides recombinés permettent la multiplication (ou amplification) des fragments d'ADN, et on obtient ainsi une collection de clones bactériens nommée **banque génomique** d'ADN. Si l'on part d'une collection d'ADN complémentaires d'ARNm produits par un type cellulaire donné, on obtient une **banque d'ADNc**.

**• Les différents types de vecteurs :** on en distingue deux grandes catégories, selon qu'ils sont destinés seulement à la multiplication des fragments d'ADN intégrés, ou bien selon qu'ils doivent permettre **l'expression de gènes** contenus dans l'ADN cloné. Chez ces derniers, il est nécessaire qu'existent des signaux appropriés intervenant dans la transcription (promoteur et terminateur).
Dans tous les cas, les vecteurs doivent contenir une **origine de réplication** adaptée au type de cellule-hôte qui les reçoit. Ils doivent posséder en outre un ou deux gènes permettant la **sélection des clones** bactériens ou eucaryotiques qui les hébergent ; en général, il s'agit de gènes de résistance à des antibiotiques.

**• La transfection des cellules :** il existe de nombreuses techniques physiques ou chimiques pour faire pénétrer un vecteur d'ADN dans une cellule-hôte en culture : la lipo-

fection, la méthode au phosphate de $Ca^{2+}$, l'électroporation ou la biolistique. Dans le cas de la réalisation d'organismes animaux génétiquement modifiés (voir plus loin), c'est en général la micro-injection dans le noyau de l'œuf qui est pratiquée.

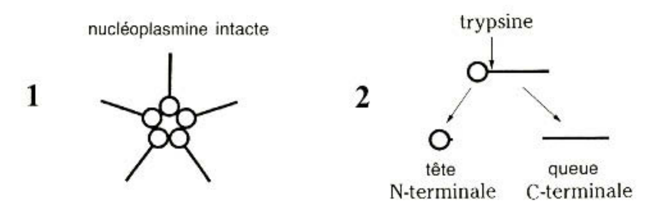
• **Les applications pratiques :** cette méthode permet de suppléer un gène déficient, en le remplaçant ou en le modifiant pour restaurer son activité au niveau de certaines parties d'un organisme (**thérapie génique**). Elle permet également d'obtenir des organismes entiers dont le matériel génétique a été modifié, ce qui est un objectif très différent ; il s'agit de la fabrication des **OGM**.

### La nucléoplasmine

La nucléoplasmine est une grosse protéine spécifiquement nucléaire, très abondante dans le noyau des ovocytes d'amphibiens. Cette protéine possède un rôle important dans l'assemblage de la chromatine, en se liant aux histones ; elle est stockée en grande quantité dans cet organite car les premières divisions très rapides de l'embryon se font sans synthèses protéiques.

La masse moléculaire de la nucléoplasmine est de 175 kDa ; il s'agit d'un pentamère (5 sous-unités identiques de 35 kDa) facilement dissociable de façon réversible *in vitro*, en changeant simplement les conditions physicochimiques du milieu.

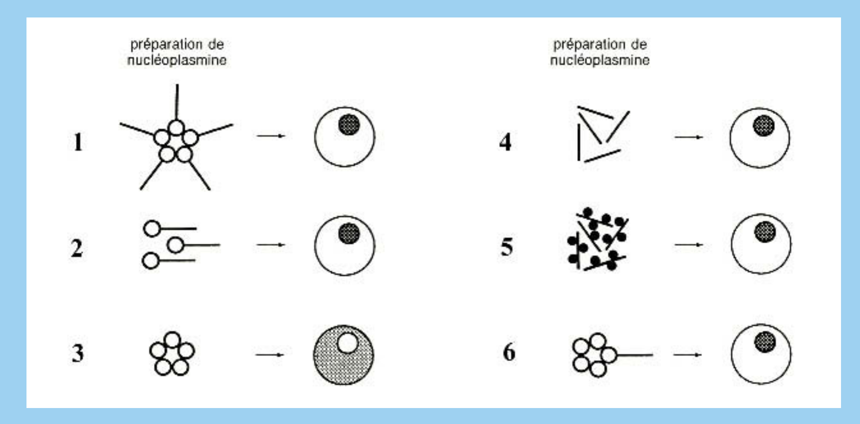
Les schémas suivants montrent l'organisation du pentamère (1) et d'un monomère (2), qui possède une extrémité N-terminale globulaire de 12 nm de diamètre, et une longue queue C-terminale ; une protéolyse ménagée par la trypsine sépare ces deux domaines en un point situé sur le schéma par la pointe de la flèche.




# Adressage de la nucléoplasmine

Les ovocytes de Xénope sont des cellules géantes de 1,2 mm de diamètre, dont le noyau lui-même est de grande taille (200-300 µm de diamètre) ; ceci permet de réaliser aisément des micro-injections bien ciblées dans cet organite ou dans le cytoplasme. Ils constituent donc un outil de choix pour des études sur l'adressage des protéines vers le noyau. L'exemple de la nucléoplasmine est étudié dans cet exercice.

Il est facile de purifier cette protéine à partir des ovocytes, puis de la marquer radioactivement. Il est également possible de la dissocier en ses monomères et, après séparation et purification de ces derniers sur gradient (cf. fiche 15), de les marquer de la même manière. Enfin, les deux domaines N-terminal et C-terminal obtenus à partir des monomères par voie enzymatique peuvent aussi être purifiés et radiomarqués.
Afin d'analyser les mécanismes précis de l'adressage de cette protéine vers le noyau, les expériences suivantes ont été réalisées :
1) pentamère entier radiomarqué et injecté dans le cytoplasme, puis après 30 min, traitement histologique et autoradiographie des coupes d'ovocytes,
2) monomère entier radiomarqué, injecté dans le cytoplasme, puis protocole identique au précédent,
3) têtes seules radiomarquées injectées (idem),
4) queues seules radiomarquées injectées (idem),
5) queues non radiomarquées, mais sur lesquelles des billes d'or colloïdal de 20 nm de diamètre ont été greffées, puis observation en microscopie électronique.
6) cinq têtes et une seule queue radiomarquées (protocole idem 1).
Les résultats de ces expériences sont présentés dans les schémas suivants, où le noyau des ovocytes est représenté par un rond légèrement excentré. La présence de la nucléoplasmine marquée observée après les 30 min est indiquée par un pointillé.




**1.** Quelles conclusions tirez-vous des résultats des expériences 1 et 2 ?
**2.** Quelles hypothèses formulez-vous après analyse des expériences 3 et 4 ?
**3.** Quelle réserve concernant l'adressage peut-on cependant formuler après analyse du résultat de l'expérience 4 ?
**4.** Dans quel but l'expérience 5 a-t-elle été construite ?
**5.** Quelle information définitive vous apporte le résultat de l'expérience 6, en ce qui concerne le mécanisme de l'adressage de la nucléoplasmine vers le noyau ?

## Solution

**1.** Ces deux expériences montrent que la nucléoplasmine, après injection dans le cytoplasme, se retrouve rapidement dans le noyau et qu'il n'en reste plus du tout dans le cytoplasme. Elles mettent bien en évidence le **phénomène d'adressage** :

– dans l'expérience 1, la taille de la molécule entière permet déjà d'exclure qu'il s'agit d'un simple processus de diffusion, puisque le diamètre efficace pour ce phénomène est au maximum de 9-10 nm, ce qui est très inférieur à celui attendu pour le pentamère. De plus, le fait qu'il n'existe pas un équilibre de concentration entre le noyau et le cytoplasme montre bien que l'adressage est un **processus actif**.
– l'expérience 2 montre que chaque sous-unité du pentamère possède **les mêmes propriétés que la molécule entière**. La taille de la tête (12 nm) étant supérieure au diamètre permettant la diffusion, il faut sans doute exclure une entrée passive dans le noyau. Le mécanisme moléculaire d'adressage doit résider au niveau du monomère.

**2.** Ces expériences montrent que les deux parties de la molécule **n'ont pas les mêmes propriétés** vis-à-vis de l'adressage :

– l'expérience 3 montre que les 5 têtes seules du pentamère restent dans le cytoplasme et n'ont donc plus la capacité à être dirigées vers le noyau ; elles ne peuvent pas rentrer dans cet organite par diffusion, en raison de la taille de l'assemblage. Elles ne possèdent donc **pas de séquence-signal** d'adressage.
– d'après l'expérience 4, les queues seules sont adressées vers le noyau, et y sont concentrées, comme dans les expériences 1 et 2. On peut donc formuler l'hypothèse qu'**elles possèdent une séquence**-signal d'adressage.

**3.** La réserve que l'on peut formuler concernant le transport des queues vers le noyau est que, leur masse étant très faible (< 35 kDa) et leur forme allongée, on ne peut pas exclure un simple transport par diffusion à travers les pores nucléaires. Un mécanisme de **diffusion/rétention** dans le noyau peut amener à un même résultat.

**4.** Le fait de greffer des billes d'or d'un diamètre de 20 nm sur les queues permet de vérifier si la taille est un facteur déterminant : comme les queues ainsi traitées continuent de rentrer, c'est bien qu'il y a un **transport actif** en jeu.

**5.** Cette expérience montre qu'**une seule queue** est capable d'assurer l'envoi de la molécule presque complète dans le noyau ; c'est à son niveau qu'on devra chercher la séquence d'adressage. On a montré qu'il s'agit ici d'une séquence en 2 fragments.

FICHE 27

# Les matrices extracellulaires

## I Un composant universel des organismes multicellulaires

Dans la plupart des tissus animaux ou végétaux, les cellules ne sont pas étroitement accolées les unes aux autres, mais sont en contact avec un constituant extracellulaire parfois très abondant, formé de macromolécules sécrétées. La composition et l'organisation complexes de cette structure universelle nommée matrice extracellulaire (MEC), ont longtemps été méconnues. Ses fonctions sont multiples et dépassent largement, en particulier chez les animaux, le seul rôle de soutien qui est lui est généralement attribué.

• **Nature et composition chimique des MEC animales :** elles sont très développées dans les **tissus conjonctifs**, où elles représentent un volume souvent plus important que celui des cellules elles-mêmes. Le derme, les os, le cartilage, les tendons, sont des exemples de tissus la MEC est très développée. On y trouve des **protéines fibreuses**, telles que le collagène et l'élastine, ainsi que des **glycoprotéines**, des **protéoglycanes** (protéines très riches en glucides), ainsi qu'un polysaccharide acide : **l'acide hyaluronique**. Ces constituants sont sécrétés par des cellules spécialisées : les fibroblastes et leurs dérivés (ostéocytes, chondrocytes…).
Tous les épithéliums reposent sur des **lames basales**, qui sont les MEC spécifiques de ces tissus de recouvrement. Elles contiennent un **collagène** particulier (collagène de type IV), ainsi que des protéines nommées **laminine** et **fibronectine**. Ces dernières entrent en contact avec la membrane plasmique des cellules épithéliales et permettent ainsi leur adhérence aux tissus conjonctifs sous-jacents.

• **Nature et composition chimique des MEC végétales :** les **parois** des cellules végétales représentent une MEC équivalente à celles rencontrées chez les animaux. Par leur disposition extracellulaire, leur constitution chimique, leur épaisseur parfois considérable et leurs fonctions, elles en possèdent toutes les caractéristiques. On y trouve une molécule fibreuse, la **cellulose**, et des molécules de remplissage : les **hémicelluloses** et les **pectines** ; tous ces constituants sont des polysaccharides (elles contiennent aussi des glycoprotéines, mais en faible quantité). Dans les tissus de soutien tels que le collenchyme et le sclérenchyme, les parois sont très épaisses.

• **L’architecture des MEC :** elles possèdent toutes plusieurs points communs en ce qui concerne leur organisation : on y trouve toujours des molécules fibreuses et des molécules de remplissage, formant un ciment entre les fibres. Les premières assurent une bonne **résistance à la traction**, tandis que les secondes permettent une grande **résistance à la compression**.
Ces caractéristiques mécaniques font que les MEC constituent, à l’image du béton armé, un excellent **matériau de soutien**. De plus, chez les animaux comme chez les végétaux, on observe souvent une disposition entrecroisée des molécules fibreuses (collagène ou cellulose) rappelant l’organisation du contre-plaqué.

• **Les fonctions des MEC :** outre une fonction universelle évidente de soutien, les MEC des organismes animaux ont un rôle dans la **prolifération** et la **différenciation** des cellules qui leur sont associées, un « dialogue » constant s’établissant entre la cellule et son environnement immédiat. Chez les embryons, elles jouent aussi un rôle crucial dans les **migrations** cellulaires.

## II Le triage des cellules ; la cytométrie en flux

Plusieurs méthodes sont utilisées pour séparer des types cellulaires différents coexistant au sein des cultures, qu’il s’agisse de cellules à un stade différent de leur cycle, pour des cultures homogènes (lignées cellulaires, cf. fiche 14), ou de cellules de nature différente, comme on peut en obtenir lors des cultures primaires.

• **La technique de centrifugation :** elle consiste à séparer les cellules comme on le fait pour les organites à partir d’un homogénat (cf. fiche 15) ; les grosses cellules peuvent ainsi être séparées des petites, et celles plus denses de celles qui sont plus légères. Cependant, on voit bien quelles sont les **limites de cette méthode**, quand on a affaire à des caractéristiques variant de manière continue, donc peu discriminantes.

• **L’utilisation d’anticorps :** elle permet de reconnaître des protéines spécifiques de la surface cellulaire et constitue un outil très puissant pour sélectionner un type cellulaire donné dans une boîte de culture. Si le fond de la boîte est tapissé d’une **matrice** sur laquelle des **anticorps** ont été fixés, seules les cellules possédant l’antigène de surface correspondant seront retenues. Il sera alors possible d’éliminer par décantation les cellules « contaminantes » et de récupérer uniquement (par agitation, par exemple) les cellules intéressantes.
De manière analogue, on peut fixer des anticorps spécifiques sur des **microbilles magnétiques** et récupérer uniquement les cellules porteuses de l’antigène d’intérêt correspondant, qui se sont fixées dessus. Cette suspension de billes est ensuite soumise à un champ magnétique puissant qui les retient, ce qui permet d’éliminer toutes les autres cellules non fixées.

• **La cytométrie en flux :** la méthode de séparation la plus sophistiquée utilise un gros appareil complexe appelé FACS (*fluorescence activated cell sorter*), ou « trieur de cellules ». Son principe est le suivant :

- les cellules à séparer à partir d'un mélange sont spécifiquement reconnues par un **anticorps fluorescent** dirigé contre un antigène de leur surface ;
- la suspension cellulaire est fractionnée sous pression sous la forme d'une file de **microgouttelettes** de milieu contenant (ou pas) une seule cellule ;
- ces dernières défilent ensuite devant un **faisceau laser** qui excite le fluorochrome, ce qui permet de détecter celles contenant les seules cellules marquées ;
- le repérage de ces cellules est couplé à l'adjonction à la gouttelette de **charges électriques** de signe différent selon qu'elle contient ou pas une cellule intéressante ;
- la file de gouttelettes passe entre deux plaques électriques chargées de manière opposée, de sorte qu'elles sont **fortement déviées** dans un sens ou dans l'autre, dans ce champ électrique, selon la charge qui leur a été ajoutée. La déviation en question permet ainsi de récupérer des cellules différentes dans des récipients distincts.

## Synthèse des molécules des MEC

Les constituants spécifiques des MEC animales ou végétales sont synthétisés selon des modalités diverses. Répondre par Vrai ou Faux aux propositions suivantes.

**1.** Il existe chez les Mammifères une vingtaine de gènes qui codent des collagènes différents s'organisant pour donner un grand nombre de combinaisons distinctes.

**2.** La forme sécrétée du collagène est un polypeptide simple qui s'organise en hélice triple après qu'il ait été émis dans le milieu extracellulaire.

**3.** Les protéoglycanes membranaires et des protéoglycanes extracellulaires sont tous deux synthétisés dans le RER et glycosylés dans l'appareil de Golgi.

**4.** Tous les glycosaminoglycanes sont des molécules polysaccharidiques acides que l'on retrouve à l'état libre dans le milieu extracellulaire.

**5.** Les intégrines sont des protéines sécrétées que l'on retrouve dans les espaces extracellulaires, tout comme la laminine et la fibronectine.

**6.** De même que pour la synthèse de l'acide hyaluronique, la polymérisation de la cellulose chez les cellules végétales se réalise directement à la surface membranaire.

**7.** Les pectines et les hémicelluloses sont émises *via* des vésicules golgiennes.

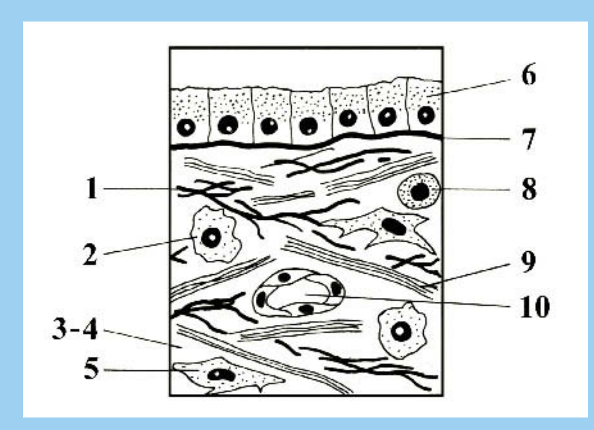
**8.** La lignine est un polysaccharide rencontré dans les parois végétales secondaires.

## Solution

**1. Vrai** : il existe environ 10 combinaisons de ces molécules, dont 4 sont abondantes dans les tissus animaux (le collagène de type I représentant à lui seul 90 % du total).
**2. Faux** : la triple hélice est la forme sécrétée, sous la forme de procollagène ; après un découpage terminal, les molécules de collagène s'organisent en longues fibres.
**3. Vrai** : toutes ces molécules suivent la voie de sécrétion classique.
**4. Faux** : seul l'acide hyaluronique est libre ; tous les autres sont liés à des protéines, sous la forme de protéoglycanes, qui sont des molécules hautement hydrophiles.
**5. Faux** : il s'agit de protéines membranaires qui se lient aux deux autres protéines.
**6. Vrai** : ce mode de synthèse très original est un point commun aux deux règnes.
**7. Vrai** : ces composés sont fabriqués dans le Golgi et sont émis par exocytose.
**8. Faux** : il s'agit en fait d'un polymère complexe et hydrophobe formé d'unités phénoliques ; sa présence imperméabilise les parois et conduit à la mort des cellules.

## Organisation d'un tissu conjonctif lâche

Le schéma suivant illustre la structure générale d'un tissu conjonctif lâche semblable à celui trouvé dans le derme. Compléter les légendes en précisant bien la nature des molécules et des cellules rencontrées dans ce tissu.




## Solution

**1.** fibres élastiques formées d'**élastine**, une protéine hydrophobe réticulée,
**2.** macrophage, **cellule immunitaire** à fonction défensive par phagocytose,
**3.** et **4.** ciment formé de **glycosaminoglycanes** et de **protéoglycanes**,
**5. fibroblaste** sécrétant toutes les molécules constitutives de la MEC,

**6.** épithélium **unistratifié**, comme on en trouve dans le tractus digestif, par exemple,
7. **lame basale**, MEC typique d'un épithélium, faisant le lien avec le tissu conjonctif,
**8. mastocyte**, cellule sécrétrice d'histamine impliquée dans les réactions allergiques,
**9.** fibres de **collagène I** entrecroisées, peu abondantes et disposées de façon lâche,
**10. capillaire sanguin** irriguant le tissu, et voie de sortie des divers leucocytes.

## La culture *in vitro* des chondrocytes

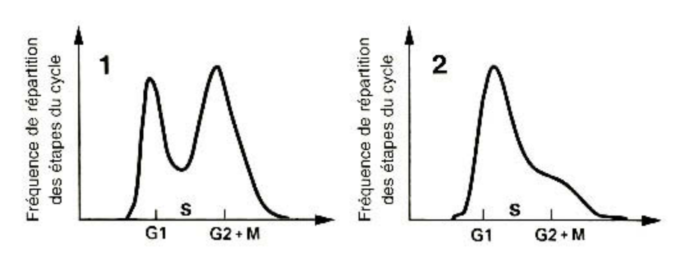
Il est possible, par **digestion enzymatique de la matrice** du cartilage embryonnaire de poulet, d'obtenir une population de chondrocytes que l'on peut ensuite mettre en culture *in vitro*. Deux types de milieux sont utilisés : 1) milieu standard et boîtes de Petri en plastique, 2) milieu contenant des facteurs de croissance appropriés et boîtes au fond desquelles on a préalablement déposé une couche de collagène.

Après deux semaines de culture on observe, sur le premier milieu, que les cellules **prolifèrent activement** mais se dédifférencient progressivement en cellules de type fibroblaste ; sur le second milieu, en présence d'une MEC artificielle, les cellules sont moins nombreuses mais **conservent leur différenciation** et sécrètent leur collagène (type II) et leur protéoglycane (agrécane) spécifiques.

Une des utilisations du trieur de cellules (FACS) est de cribler les cellules d'une culture homogène selon le **stade du cycle** dans lequel elles se trouvent ; dans ce cas, on utilise un colorant fluorescent de l'ADN, dont la quantité est alors mesurée dans chaque cellule. Il est ainsi possible de récupérer et quantifier diverses populations de cellules synchrones (en G1, S ou G2/M), ce qui permet d'étudier le cycle cellulaire et d'évaluer le caractère prolifératif d'une culture (cf. fiche 14).

Les cellules de ces deux cultures sont récupérées et analysées avec un FACS.

Les résultats sont présentés dans les deux graphes suivants, qui donnent le nombre de cellules (ordonnées) en fonction de la quantité d'ADN de leur noyau (abscisses) et donc de leur place dans le cycle cellulaire : 1) premier milieu, 2) second milieu.




Ces graphes montrent bien que les deux cultures ne sont pas identiques : la 1re contient beaucoup de cellules en G2/M, qui vont se diviser ou se divisent, alors que la 2e contient essentiellement des cellules en G1, stade caractéristique des cellules différenciées et qui ne s'engagent pas dans un processus de division.

# La signalisation cellulaire

## I La communication entre les cellules au sein de l'organisme

Au sein des organismes complexes, les cellules communiquent en permanence avec les cellules voisines de façon à réguler leur comportement pour répondre aux besoins et aux exigences de l'organisme entier. Le principe est le suivant : les cellules émettrices sécrètent une molécule qui est véhiculée dans l'organisme, puis captée par des récepteurs, le plus souvent membranaires (cf. fiche 5), portés par les cellules cibles. Ces dernières modulent leur activité ou leur devenir : croissance, division, différenciation ou mort cellulaire, en fonction du signal perçu ou, le plus souvent, d'une combinaison de signaux.

• **Les différents modes de communication entre cellules différentes :** on en distingue quatre grands types :
1) **endocrine**, *via* des hormones agissant parfois à longue distance,
2) **paracrine**, entre cellules très proches, *via* des médiateurs locaux,
3) **synaptique**, entre un neurone et sa cellule-cible, *via* un neurotransmetteur,
4) **de cellule à cellule**, *via* des interactions directes entre protéines membranaires.

• **Les principales molécules informatives :** elles sont classées en deux catégories :
1) les molécules **hydrophiles** : protéines, peptides, acides aminés ou leurs dérivés, nucléotides ; elles ne peuvent franchir la membrane plasmique et nécessitent donc des **récepteurs de surface membranaires** pour être perçues ;
2) les molécules **hydrophobes** : acides gras ou leurs dérivés, stéroïdes, rétinoïdes, et même des gaz : le NO ou l'éthylène (chez les végétaux) ; elles franchissent les membranes et rencontrent des **récepteurs cytosoliques ou nucléaires**.

• **Les récepteurs membranaires :** il en existe quatre grandes familles :
1) les récepteurs couplés aux protéines G, 2) les récepteurs catalytiques à activité tyrosine kinase, 3) les récepteurs non catalytiques à activité tyrosine kinase, 4) les récepteurs-canaux.

Chaque catégorie est associée à des protéines intracellulaires spécifiques. On rappelle l'existence des **protéines G hétérotrimériques**, localisées dans la membrane plasmique, du côté cytosolique ; elles interagissent avec leur récepteur activé, sont modifiées, puis entrent en contact avec diverses protéines, membranaires ou pas, qui vont enclencher à leur tour une cascade complexe de réactions. On distingue des protéines G stimulatrices ou inhibitrices.

• **Les cascades de transduction intracellulaires :** sous l'action des protéines activées précédentes, une longue voie de signalisation est mise en route. Deux voies majeures existent, qui ne sont pas détaillées ici : celle enclenchée par les **protéines G**, qui fait intervenir l'AMP cyclique, le calcium, et les phosphoinositides, et celle dite des **MAP kinases,** qui contrôlent par exemple la prolifération cellulaire.

# II L'utilisation de la GFP

Depuis une quinzaine d'années (prix Nobel 2008), cette technique a révolutionné la Biologie Cellulaire. Grâce aux méthodes du génie génétique (cf. fiche 26), il est en effet possible de marquer *in vivo* toutes les protéines synthétisées par les cellules, au moyen d'une petite protéine fluorescente : la *green fluorescent protein*, ou GFP.

• **Nature de la GFP :** cette protéine de 238 acides aminés a été découverte chez la méduse *Aequorea victoria* ; sa caractéristique remarquable est de **naturellement fluorescer en vert**, à 505 nm, sans addition de fluorochrome artificiel, après excitation par une lumière UV ou bleue (395 nm et 475 nm). La structure de la GFP est remarquable : il s'agit d'un tonneau formé de 11 feuillets β, au centre duquel se situe une courte hélice α formant le centre actif fluorescent (**chromophore**).

• **Utilisation de la GFP :** le gène de la GFP a été isolé et cloné en 1992, puis il a été rapidement utilisé pour fabriquer *in vitro* des **constructions génétiques** (plasmides) dans lesquelles la partie codante du gène est mise à la suite de celle d'une protéine d'intérêt, encadrées par tous les signaux appropriés de transcription et de traduction.
Lorsque ce type de plasmide est introduit dans une cellule vivante, il est capable de s'y exprimer, c'est-à-dire qu'il permet la **synthèse d'une protéine chimère** (ou protéine de fusion) contenant la séquence de la protéine d'intérêt fusionnée à celle de la GFP. Cette molécule garde ses propriétés biologiques tout en étant fluorescente lorsqu'on éclaire la cellule avec une lumière excitant la GFP, qui fonctionne donc comme une **protéine rapporteur** classique.

• **Les applications de la GFP :** grâce à cet artifice, on peut suivre au microscope, en temps réel et dans une cellule vivante, toutes les étapes de synthèse et de circulation d'une protéine donnée, c'est-à-dire sa dynamique et celle des compartiments cellulaires dans lesquels elle circule de façon normale. La GFP a été fusionnée avec des protéines

impliquées dans **tous les organites connus** : RER, mitochondries, appareil de Golgi, cytosquelette, etc. Cette technique très puissante a rendu obsolètes les méthodes anciennes de localisation des protéines, telles que la cytoenzymologie (cf. fiche 20) ou les expériences de pulse-chasse suivies d'autoradiographie (cf. fiche 18).

• **Les nouvelles protéines fluorescentes :** plusieurs variants de la GFP ont été obtenus par modification de la séquence primaire de la protéine (grâce au génie génétique), de façon à **diversifier la longueur d'onde** d'émission : la CFP fluoresce en cyan, la YFP en jaune, etc. Leur efficacité et leurs propriétés de résistance (pH extrêmes, photoblanchiment), ont également été améliorées. D'autres protéines qui fluorescent en rouge ont aussi été **extraites de coraux**. Ceci permet l'observation simultanée de plusieurs protéines différentes marquées dans une même cellule.

### Les récepteurs à activité tyrosine kinase

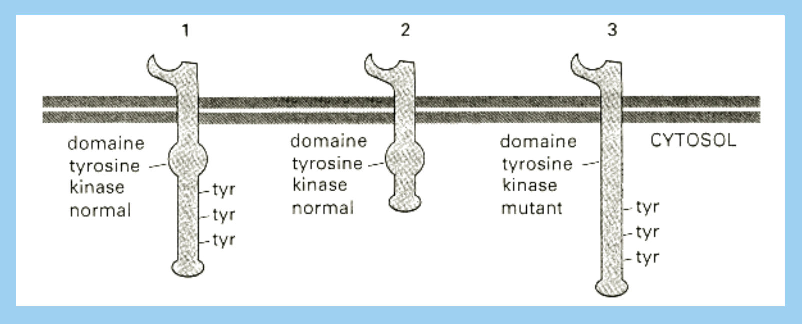
Ces récepteurs membranaires à activité catalytique sont les plus divers et les plus nombreux parmi les molécules intervenant dans la réception des signaux extra-cellulaires et l'induction de cascades de signalisation.

Leur caractéristique principale est leur capacité d'autophosphorylation : lorsqu'ils fixent leur ligand (la molécule informative extracellulaire) spécifique, ils forment des dimères dont les deux monomères sont capables de se phosphoryler mutuellement sur des tyrosines de leurs domaines intracellulaires. Ces dimères activés sont ensuite capables de phosphoryler d'autres protéines qui enclenchent les cascades.

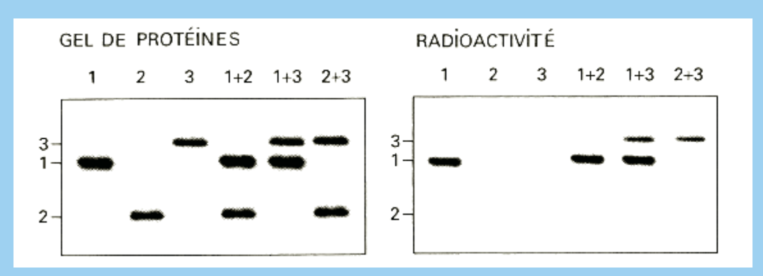
## La dimérisation des récepteurs de l'EGF

L'EGF (facteur de croissance de l'épiderme) appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Il est capable de dimérisation et d'autophosphorylation ; les expériences suivantes permettent de démontrer ces propriétés :
1) le gène de la forme normale du récepteur à l'EGF a été cloné, puis modifié *in vitro* de façon à produire des formes mutantes inactives ; ces divers gènes clonés sont ensuite intégrés dans des plasmides d'expression (cf. fiche 26) capables de fonctionner dans des cellules eucaryotiques ;
2) une lignée de cellules en culture normalement dépourvue de ce récepteur est transfectée avec ces plasmides, soit séparément, soit en combinaison, deux par deux (voir plus loin). Après un temps suffisant pour que leur expression ait lieu et que les récepteurs aient pu rejoindre la membrane plasmique, les cellules sont mises en présence d'EGF et chargées simultanément en ATP radioactif ;

3) cinq minutes plus tard, les cellules sont broyées, les protéines sont récupérées et soumises à une immunoprécipitation de façon à récupérer uniquement les récepteurs étudiés. Une électrophorèse en gel dénaturant SDS (cf. fiche 9) et une autoradiographie (cf. fiche 17) permettent ensuite de savoir si les protéines attendues ont été exprimées et si elles sont radiomarquées ou pas.
La figure suivante montre les 3 récepteurs étudiés : 1) le récepteur normal, 2) un récepteur dont toute la partie C-terminale, portant les Tyr. phosphorylables a été amputée, 3) un récepteur dont la partie catalytique (kinase) seule a été modifiée.




Les 6 expériences de transfection effectuées avec les 3 plasmides différents sont les suivantes : 1, 2, 3, 1+2, 1+3 et 2+3. Les schémas suivants montrent les résultats de la coloration du gel obtenu (à gauche) et de son autoradiographie (à droite) ; on rappelle que le SDS sépare les sous-unités des protéines multimériques !




**1.** Quel type d'expérience, basé sur un autre protocole de clonage, proposez-vous pour vérifier cytologiquement que les récepteurs ont été correctement mis en place dans la membrane plasmique des cellules transfectées ?
**2.** Quelle information vous apporte le gel de protéines ?
**3.** Quels résultats attendez-vous pour l'autoradiographie, dans l'hypothèse où chaque récepteur (monomérique) serait capable de se phosphoryler lui-même ?
**4.** Même question dans l'hypothèse où seul le dimère formé après fixation du ligand, serait capable de s'autophosphoryler.
**5.** Quel modèle retenez-vous d'après les résultats expérimentaux obtenus ?

## Solution

**1.** Il est possible d'utiliser les **propriétés de la GFP**, que l'on peut alors coupler aux récepteurs étudiés. On pourra visualiser, au microscope à fluorescence, le trajet intracellulaire de la protéine, depuis le RER, qui est son lieu de synthèse, jusqu'à la membrane plasmique, qui est son lieu de destination finale (voie de sécrétion).

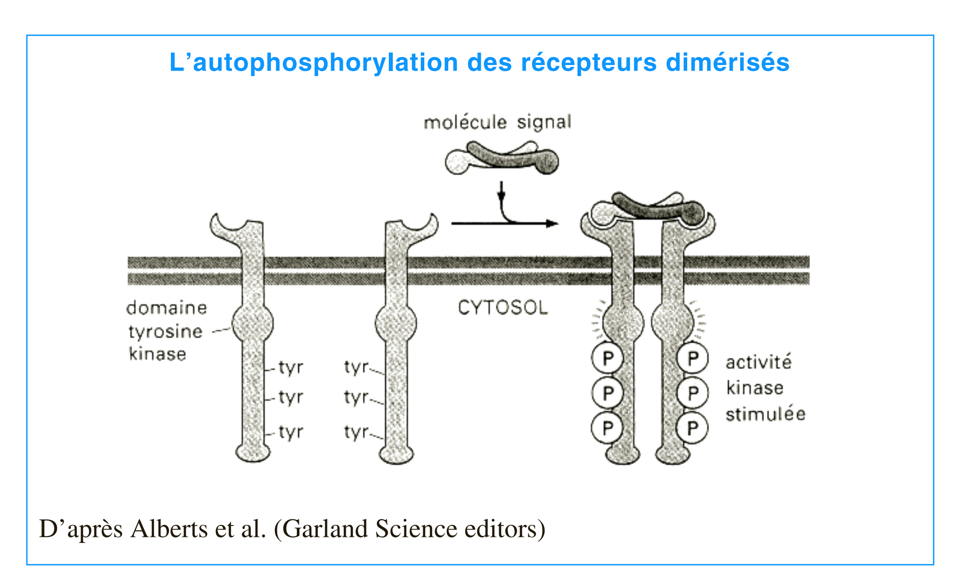
**2.** Ce gel permet de bien vérifier, pour chaque expérience, la **présence du ou des récepteurs** produits dans les cellules, après leur transfection par des plasmides.

**3.** Compte tenu de leur structure, on peut prévoir les résultats suivants, pour chaque monomère fonctionnant de façon indépendante : le monomère 1, qui possède un domaine catalytique actif et des tyr. accessibles, **pourrait théoriquement** s'autophosphoryler ; les monomères mutés 2 et 3, déficients dans le domaine porteur de tyr. ou dans le domaine catalytique, **ne peuvent pas** en théorie s'autophosphoryler.

**4.** On attend, du point de vue de la phosphorylation, que les dimères 1+1, 2+2 et 3+3 **aient le même comportement** que leurs monomères séparés. De même, dans le dimère 1+2, on prévoit que **seul le monomère 1** sera phosphorylé, le 2 ne pouvant pas l'être. En revanche, dans le dimère 1+3, **les deux monomères** pourront être phosphorylés par le 1. Enfin, dans le dimère 2+3, **le monomère 2** ayant un domaine catalytique actif peut phosphoryler le 3, mais lui-même ne pourra pas l'être.

**5.** D'après les résultats de l'autoradiographie pour les deux dernières situations, qui correspondent exactement aux prévisions énoncées dans la réponse 4, on conclut que la formation du dimère est une **étape préalable indispensable** à la phosphorylation, qui peut affecter alors les deux partenaires. Le schéma présenté dans l'encart suivant illustre ce phénomène.

### L'autophosphorylation des récepteurs dimérisés




D'après Alberts et al. (Garland Science editors)

FICHE 29

# La différenciation cellulaire

## I De multiples définitions

Les animaux et les végétaux pluricellulaires sont formés d'organes spécialisés dans la réalisation de fonctions intégrées au sein de l'individu ; ces derniers sont constitués d'ensembles cellulaires homogènes nommés tissus. Comme toutes les cellules d'un même organisme contiennent la même information génétique, la différenciation cellulaire résulte de l'expression contrôlée des gènes ; celle-ci se traduit donc à tous les niveaux, depuis les molécules informationnelles synthétisées par la cellule jusqu'à sa forme caractéristique, reconnaissable au microscope.

• **La différenciation morphologique :** l'étude anatomique et histologique permet de reconnaître plus de 200 **types cellulaires distincts** chez un animal supérieur, et près de 30 chez un végétal supérieur. La taille de la cellule, sa forme, l'importance inhabituelle de telle ou telle structure ou organite, sont des critères d'identification rapides : on reconnaît immédiatement au microscope (cf. fiches 1, 2, 6 et 8) une hématie, une cellule de foie, de muscle, de cerveau, de pancréas exocrine, etc.

• **La différenciation biochimique et physiologique :** l'hypertrophie d'un organite ou d'une structure se traduit par une **abondance caractéristique de molécules** spécifiques. L'électrophorèse et la chromatographie (cf. fiches 9 et 22), sont les techniques privilégiées pour l'analyse de ce type de différenciation. L'hémoglobine des hématies, le glycogène des myocytes ou des hépatocytes, les triglycérides des adipocytes, la chlorophylle des cellules végétales sont des exemples classiques de ces molécules.
Les **voies de biosynthèse** de tous ces composés sont évidemment spécifiques, et donc les **enzymes** qui y interviennent ; la RUBISCO, présente dans les cellules photosynthétiques où elle fixe le $CO_2$ (cf. fiche 23), est un bon exemple d'une enzyme particulièrement abondante.

• **Le contrôle de l'expression des gènes :** le premier niveau de régulation de l'expression du génome est celui de la **production d'ARNm** spécifiques, ou en quantité très abondante, dans certains types cellulaires. La quantification de ces ARNm nécessite en général l'emploi de sondes nucléiques (cf. fiche 12), utilisées dans des approches de

Biologie Cellulaire (*in situ*) ou Moléculaire (après électrophorèse). Ceci ne doit pas faire oublier les nombreux autres mécanismes de **contrôle post-transcriptionnel** intervenant dans la synthèse des protéines : inactivation ou stockage des ARNm, modulation de la traduction, etc.

# II Les techniques électrophysiologiques

Ces techniques permettent d'étudier les potentiels électriques transmembranaires, les concentrations ioniques et les échanges d'ions à travers les membranes biologiques. Elles ont été développées, historiquement, pour l'étude des cellules animales dites électriquement excitables : les cellules nerveuses, musculaires et sensorielles. Elles sont appliquées actuellement à toutes les cellules, puisque des canaux ioniques ont aussi été mis en évidence chez les bactéries, les cellules végétales et les Protistes.

• **Leur principe :** elles nécessitent l'emploi de microélectrodes ultrafines qui sont implantées dans les cellules, et dont l'extrémité mesure une fraction de μm. Leur taille doit être suffisamment petite pour que les cellules ne soient pas lésées lors de l'introduction : la membrane plasmique se referme sur l'électrode et il n'y a pas de court-circuit à ce niveau. Leur lumière est remplie d'une solution saline (ex : KCl) permettant le passage d'un courant électrique, c'est-à-dire un mouvement d'ions.

• **Les applications :**

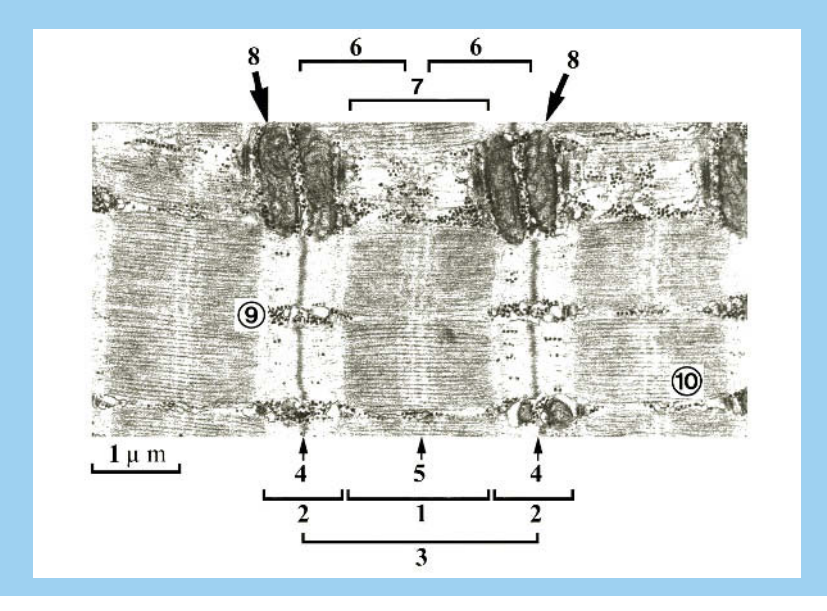
- pour la mesure d'un **potentiel de membrane** ou celle d'un flux ionique (potentiel de repos ou potentiel d'action des neurones), deux électrodes sont utilisées, l'une située à l'extérieur de la cellule et l'autre située à l'intérieur ; les deux sont reliées à un amplificateur et à un voltmètre appropriés ;
- pour la mesure des **concentrations intracellulaires d'ions** particuliers, on utilise des électrodes fonctionnant sur le principe de celles du pH mètre ; elles sont chargées avec un ion particulier, et ne sont perméables qu'à cet ion. Plongées dans une cellule, en même temps qu'une autre électrode de référence, elles permettent la mesure de la concentration intracellulaire de l'ion considéré, à travers la mesure d'une différence de potentiel imposée et telle qu'aucun courant ne passe.

• **Le « patch clamp » :** depuis les années 1980, cette technique permet l'étude de **canaux ioniques individuels** : une microélectrode est étroitement **appliquée à la surface** de la membrane plasmique et est reliée à un amplificateur de courant capable de détecter des courants de quelques pico-ampères (avec un voltage imposé = « clampé »). Le courant peut alors être mesuré dans différentes configurations du morceau de membrane analysé (le « patch »), qui contient un nombre limité de canaux : **membrane en place** dans la cellule, ou **membrane décrochée** de la cellule, dans une **orientation nor-**

**male ou retournée**. Il est ainsi possible d'analyser le fonctionnement de canaux uniques et de décrire leur ouverture, leur fermeture, leur conductance, et également d'étudier sur eux les effets de certaines concentrations ioniques, de différentes drogues situées à l'extérieur ou à l'intérieur des cellules, etc.

## La fibre musculaire squelettique striée

Ce cliché représente une coupe longitudinale d'un fragment de muscle squelettique observée en microscopie électronique à transmission (cf. fiche 1). Compléter les légendes et identifier les différents éléments de structure.




## Solution

**1. Bande sombre** en microscopie électronique, dite A, ou anisotrope en lumière polarisée au microscope photonique,
**2. Bande claire**, dite I, ou isotrope en lumière polarisée au microscope photonique,
**3. Sarcomère** : unité d'organisation de la myofibrille et de contraction de la fibre musculaire, limitée par les 2 disques Z,
**4. Disque** (strie) **Z** : zone d'ancrage des microfilaments d'actine, riche en α-actinine,
**5. Zone médiane** claire du sarcomère (dite H), avec une ligne sombre centrale nommée M, lieu d'accrochage des faisceaux de myosine entre eux,
**6.** Microfilaments d'**actine** disposés symétriquement dans le sarcomère,




**7.** Filaments épais de **myosine** occupant la bande A, formés de deux faisceaux symétriques opposés et à cheval sur les microfilaments d'actine,
**8. Mitochondries** de grande taille situées entre les myofibrilles,
**9.** Granules noirs de **glycogène**, réserve énergétique du muscle,
**10.** Travée longitudinale de **réticulum sarcoplasmique** (lisse), réserve d'ions $Ca2^+$.

## Différenciation des fibres musculaires striées

Les muscles squelettiques striés des Vertébrés sont en règle générale constitués d'une combinaison de 3 types de cellules (fibres musculaires, ou myocytes) différentes ; leur proportion varie selon la nature du muscle et surtout la façon dont il est sollicité par une activité physique.
Dans cet exercice, deux types de fibres musculaires bien différenciées sont comparés au plan structural et fonctionnel : les fibres « rouges » ou fibres I, et les fibres « blanches » ou fibres II. Les muscles riches en l'une ou l'autre catégorie se distinguent par leur couleur (on parle de viandes rouges et de viandes blanches).
Les caractéristiques moléculaires et cytologiques de ces fibres sont les suivantes :

| | Fibres I | Fibres II |
|---|---|---|
| diamètre | fin : 40 µm | épais : 80 µm |
| mitochondries | nombreuses | peu nombreuses |
| enzymes de la glycolyse | peu actives | très actives |
| glycogène | peu abondant | très abondant |
| triglycérides | très abondants | peu abondants |
| myoglobine | abondante | peu abondante |

**1.** Avec quelle technique peut-on mettre en évidence spécifiquement le glycogène ?
**2.** Quel est le rôle possible du glycogène et des lipides présents dans ces cellules ?
**3.** Quelles sont les différences de structure, de fonction et de localisation existant entre la myoglobine et la globine ?
**4.** D'après l'ensemble de ces données, quel type de métabolisme énergétique peut-on prévoir pour ces deux types de fibres musculaires ?

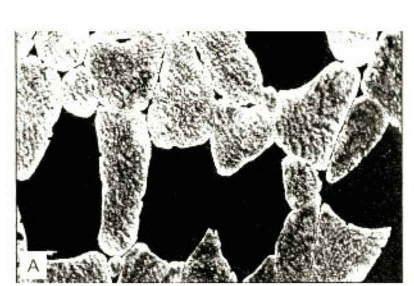
## Solution

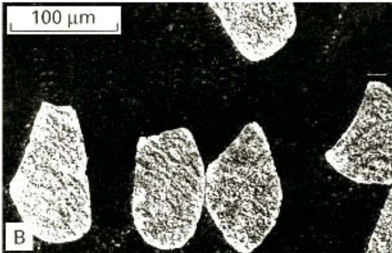
**1.** Certaines techniques de coloration, dites cytochimiques, permettent de détecter des composés chimiques particuliers *in situ*, sur des coupes histologiques. La coloration de **Feulgen** révèle ainsi la présence de l'ADN dans le noyau ; de même, la **coloration dite APS** : acide periodique/schiff, permet de visualiser le glycogène, l'amidon ou la cellulose (en fait tous les polysaccharides).

**2.** Ces deux composés sont des **réserves énergétiques** que les cellules stockent dans leur cytoplasme : le glycogène est un polymère de **glucose**, tandis que les acides gras des lipides servent à produire de **l'acétyl-coenzyme A**, qui sera dégradé.
**3.** La myoglobine est une protéine héminique rencontrée dans le cytoplasme des cellules musculaires ; constituée d'une seule sous-unité, elle fixe et **stocke l'$O_2$**. Formée de 4 sous-unités, l'hémoglobine se trouve dans le cytoplasme des hématies, où elle fonctionne comme **transporteur d'$O_2$**, grâce à ses propriétés allostériques.
**4.** Par leurs caractéristiques biochimiques et cytologiques : abondance ou pas de myoglobine et d'enzymes de la glycolyse, nature des réserves énergétiques (glucose utilisé dans la glycolyse, acides gras utilisés dans les mitochondries), présence ou pas de mitochondries, on déduit que le métabolisme des fibres I est de **type aérobie** (respiration), tandis que celui des fibres II est de **type anaérobie** (fermentation).

## Différenciation fonctionnelle des fibres musculaires striées

Plusieurs espèces de myosine peuvent être purifiées à partir d'un même muscle de Vertébré. Il existe en effet, au sein du génome, de multiples copies de gènes codant pour la myosine et donnant des protéines légèrement différentes qui se distinguent en particulier par leur capacité à hydrolyser plus ou moins rapidement l'ATP : on parle de **myosines lentes** et de **myosines rapides**. Deux anticorps (AC) spécifiques obtenus contre des formes de myosine de ce type sont testés en immunofluorescence sur deux coupes successives de muscle ; les clichés suivants montrent, en A : l'image obtenue pour l'AC anti-myosine lente, en B : l'AC anti-myosine rapide.






Ces deux clichés parfaitement complémentaires illustrent bien l'existence des deux types de fibres. Il a été montré que les fibres à myosine lente sont les fibres de type rouge (I), à métabolisme oxydatif, et que celles à myosine rapide sont les fibres blanches (II), à métabolisme fermentaire. Les premières répondent à une stimulation nerveuse par une contraction lente, elles se fatiguent peu et résistent bien à un effort prolongé ; les secondes répondent par une contraction rapide, mais elles se fatiguent très vite et sont mieux adaptées à des mouvements rapides et intermittents.

FICHE 30

# Les virus

## I Des entités en marge du vivant

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires : ils ne peuvent être reproduits qu'au sein d'une cellule vivante, qui met à leur disposition tous les précurseurs métaboliques, la machinerie enzymatique et l'énergie nécessaires. L'organisation non cellulaire des particules virales (virions), leur absence d'activité métabolique et leur mode de reproduction les excluent des êtres vivants classiques.

• **L'organisation des particules virales :** elles sont toujours de très petite taille, ne dépassant généralement pas 200 nm de long. L'organisation de leur coque protéique (capside) est simple et géométrique : on distingue les virus dits **icosaédriques** et ceux dits **hélicoïdaux** ; certains virus de Bactéries sont en revanche très complexes : les **bactériophages** (dits aussi phages). Il existe des virus nus et des virus dits enveloppés, qui présentent une **membrane phospholipidique externe** provenant le plus souvent de la membrane plasmique de la cellule hôte (virus bourgeonnants)

• **L'information génétique des virus :** elle est enfermée dans la capside et est constituée d'un **ARN** ou d'un **ADN**. La forme de ce matériel génétique est très variable, pouvant être simple brin ou double brin, circulaire ou linéaire, selon les virus. De plus, dans le cas des virus à ARN simple brin, il faut considérer le cas où ce brin est porteur de sens (messager) ou pas : on parle **d'ARN positif ou négatif**.

• **Les cycles viraux :** ils sont de types très différents, selon la nature de l'information génétique virale, et selon les conséquences sur la cellule-hôte, qui peut être détruite ou pas. Dans tous les cas, cette dernière doit produire des **ARNm** qui permettront la synthèse des protéines virales ; ceci implique souvent que le virion emporte ses **propres enzymes**, car la cellule infectée ne peut pas décoder son matériel génétique.

## II Les virus utilisés comme modèles

Les Virus constituent depuis fort longtemps des outils privilégiés pour l'étude expérimentale de nombreux phénomènes moléculaires et cellulaires, tels que les processus d'**autoassemblage** moléculaire, les **mécanismes génétiques** fondamentaux (réplication et expression du génome), la **biogenèse des membranes** et le **transport intracellulaire** des protéines.

• **L'identification de la nature du matériel génétique :** c'est grâce à des virus que Hershey et Chase (1952), puis Fraenkel-Conrat (1956) ont démontré que le matériel génétique était constitué d'acides nucléiques (respectivement l'**ADN** pour le phage T4 et l'**ARN** pour le Virus de la mosaïque du Tabac). C'est aussi grâce à eux que le concept d'**ARN messager** a pu être dégagé, et qu'on a pu bénéficier de sources abondantes de ces ARNm (qui constituent en fait le matériel génétique des Virus à ARN positif), pour mettre au point les systèmes de traduction *in vitro* (cf. fiche 16).

• **L'étude de l'expression du matériel génétique :** lors d'une infection virale, la synthèse de la majorité des protéines fabriquées par la cellule-hôte est commandée par le matériel génétique viral qui prend le dessus et inhibe les processus endogènes. Pour pouvoir être déchiffré, ce **génome viral** doit présenter des caractéristiques fonctionnelles identiques à celles du génome de la cellule infectée, qu'il s'agisse d'une cellule procaryotique ou eucaryotique. De même, la machinerie de **synthèse protéique** doit pouvoir reconnaître et traduire le message d'origine virale.
En ce qui concerne l'étude de l'organisation des gènes et de leur fonctionnement, les virus ont également été très utiles : ils ont permis, par exemple, la découverte de la **structure morcelée** (dite en mosaïque) des gènes eucaryotiques.

• **Les études *in vitro* :** la connaissance des mécanismes enzymatiques de réplication a beaucoup bénéficié de l'utilisation des génomes circulaires d'ADN double brin ou simple brin de certains Virus.

• **Les avantages des systèmes viraux :** le plus souvent, et contrairement à la situation habituelle, la cellule infectée ne fabrique qu'un **nombre limité** d'espèces protéiques virales (quelques unités à quelques dizaines), et celles-ci en **quantité importante**. De plus, comme cette synthèse ne démarre qu'après l'infection, les processus de synthèse sont parfaitement **synchronisés**, et si une séquence précise d'événements cellulaires existe, elle sera aisément identifiable.
En effet, l'expérimentateur est capable de repérer les protéines virales nouvellement synthétisées par **marquage** avec des précurseurs radioactifs et autoradiographie, ou bien utilisation d'**anticorps** anti-protéines virales. L'analyse expérimentale des différentes étapes du cycle viral s'en trouve extrêmement simplifiée par rapport à l'étude des processus cellulaires normaux, beaucoup plus complexes (voir l'exercice suivant).




# Le cycle d'un virus à enveloppe : le VSV

Le Virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) est capable d'infecter *in vitro* des cultures de cellules animales (cf. fiche 14) et d'y accomplir son cycle complet. Lorsqu'une culture de cellules confluentes est inoculée avec une suspension très diluée de ce virus, on observe au bout de 48 heures des plages circulaires claires correspondant à des zones où les cellules sont visiblement mortes (plages de lyse).

**1.** Comment expliquez-vous l'origine de ces plages de lyse dans la culture ?

Lorsque le milieu de culture de plusieurs boîtes infectées de ce type est récupéré et soumis à une longue ultracentrifugation (cf. fiche 15), on récupère une fraction qui s'avère elle-même être infectieuse.

**2.** Avec quelle technique cytologique simple pouvez-vous montrer que cette fraction contient des particules virales ?

À partir de cette fraction, on extrait une très faible quantité de protéines que l'on peut analyser par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS (cf. fiche 9). Cette technique met en évidence cinq bandes, dont la plus lente possède une masse moléculaire de 69 kDa. Lorsque cette fraction est traitée par une glycosidase avant l'électrophorèse, la seule modification observée est la diminution de la taille de cette protéine, dont la masse moléculaire passe à 63 kDa.

**3.** Quelles informations sur la constitution chimique du virion cette expérience vous apporte-t-elle ?

**4.** Quelle est la localisation probable de la protéine de 69 kDa ?

**5.** Quel autre constituant majeur attendez-vous dans cette fraction ?

Un anticorps spécifique de la protéine de 69 kDa a été obtenu et un fluorochrome lui a été greffé afin qu'il puisse être utilisé dans des expériences d'immunofluorescence (cf. fiche 8). Une étude détaillée du cycle viral est ensuite conduite avec cet outil, et les données suivantes ont été obtenues :

– pendant les 4 premières heures suivant l'infection, aucune fluorescence n'est visible au sein de la cellule ;
– à partir de la 5$^{e}$ heure, une fluorescence cytoplasmique commence à être visible ;
– à partir de la 6$^{e}$ heure, la membrane plasmique devient à son tour fluorescente ;
– progressivement, le cytoplasme perd sa fluorescence, puis à son tour la membrane plasmique et, au bout de 8 h, toute fluorescence a disparu dans la cellule ;
– divers tests montrent que la cellule infectée entre ensuite dans un processus d'inactivation de son métabolisme, ce qui conduit à sa mort après 12 heures.

**6.** Donner la séquence possible des événements moléculaires et cellulaires qui rendent compte du cycle de ce virus.

## Solution

**1.** Lorsqu'une particule virale infecte une cellule, elle s'y reproduit et conduit à la production d'une **descendance qui est libérée** dans le milieu de culture. Les cellules voisines sont alors infectées par ces nouveaux virions, et **le processus se propage** aux cellules les plus proches, ce qui conduit à une zone circulaire de cellules infectées de plus en plus grande, se présentant sous la forme d'une **auréole claire** (nommée plage) car, ainsi qu'on le verra plus loin, l'infection conduit ici à la **mort cellulaire** (lyse). Ce phénomène ne peut pas s'observer si l'inoculum initial est trop dense, car toutes les cellules sont alors infectées simultanément, et on n'obtient pas de plage de lyse bien individualisée.

**2.** La technique de **coloration négative**, en microscopie électronique, est très adaptée à la visualisation rapide des particules virales (cf. fiche 11).

**3.** Le virion contient seulement **5 protéines**, dont la plus grosse (et donc la plus lente dans ce type de gel) est une **glycoprotéine**. On sait en effet que les glycosidases sont des enzymes qui décrochent ou dégradent les chaînes glucidiques ; on calcule que la masse de glucides de cette glycoprotéine est de 6 kDa.

**4.** De façon générale, les glycoprotéines sont des **protéines membranaires**. Dans le cas des virus, ces protéines se retrouvent dans l'enveloppe virale qui est un bout de la membrane plasmique de la cellule-hôte emportée lors du **bourgeonnement**.

**5.** Il s'agit du matériel génétique viral, constitué par un acide nucléique ; dans le cas du VSV, on sait qu'il est constitué d'un **ARN négatif** (anti-sens).

**6.** La première phase montre l'absence de la protéine de 69 kDa dans la cellule ; elle correspond à la **réplication et à la transcription** du matériel génétique viral, qui conduit à la production d'un grand nombre d'**ARNm** codant pour les 5 protéines virales. Dans la phase suivante, la protéine est visible dans le cytoplasme ; elle passe ensuite dans la membrane plasmique, ce qui suggère qu'elle suit la voie de sécrétion et qu'elle y est apportée par **exocytose** de vésicules golgiennes, à partir de 6 heures.

Enfin, toutes les protéines ayant été adressées à la membrane font l'objet d'un **bourgeonnement** pour former les virions qui seront libérés (ils emportent également les 4 autres protéines). La cellule ne survit pas à cette infection ; voir la suite.

## Synthèse d'une protéine membranaire du VSV

Une culture de cellules épithéliales est infectée par une suspension de virions de VSV puis, 2 heures plus tard, de la leucine $^{3}H$ est ajoutée au milieu. Sept heures après le début de l'infection, on recueille séparément le milieu de culture et les cellules épithéliales. Les protéines des virions récoltés par centrifugation du milieu sont analysées par électrophorèse (voir plus haut) et par autoradiographie : les 5 bandes observées dans le gel sont radioactives.

Lorsque les protéines totales extraites des cellules sont soumises à l'électrophorèse, on observe plusieurs centaines de bandes sur le gel, après coloration ; en revanche, l'autoradiographie ne révèle que 5 bandes, de même taille que celles des virions.
Afin de préciser les lieux de synthèse des différentes protéines virales, un protocole de fractionnement cellulaire (cf. fiche 15) est conduit au temps 5 heures sur des cellules marquées comme précédemment. Deux fractions sont obtenues : a) les microsomes rugueux et, b) les protéines solubles du cytosol.
Après électrophorèse et autoradiographie des protéines de ces fractions, on obtient les résultats suivants : a) une bande de 63 kDa ; b) 4 bandes, identiques à celles observées pour les virions.
**1.** Quelle conclusion importante tirez-vous de cette première série d'expériences ?
**2.** Sur quels types de ribosomes ces 5 protéines virales sont-elles synthétisées, et quel est le devenir de la protéine de 63 kDa ?
**3.** Pourquoi sa masse moléculaire au niveau des microsomes rugueux n'est-elle pas sa masse définitive (69 kDa), et quel processus devra encore être mis en œuvre ?
On a constaté que, lors de la phase précédant le bourgeonnement, la protéine virale de 69 kDa est mise en place uniquement dans la membrane de la face baso-latérale de l'épithélium constitué *in vitro* par les cellules en culture.
**4.** Avec quels outils pourriez-vous montrer cette localisation préférentielle ?

## Solution

**1.** Les 5 **protéines virales** sont devenues **radioactives**, ce qui est attendu, car elles ont été fabriquées par les cellules-hôtes, en présence de leucine marquée ; ceci est bien confirmé par l'étude des protéines totales extraites des cellules. En revanche, **aucune protéine cellulaire n'est marquée**, ce qui montre que la traduction est totalement bloquée pour les protéines endogènes.
Cet arrêt complet est contrôlé par le virus, et ceci conduit fatalement à la **mort de la cellule**, dont toute l'activité a été détournée par son parasite, à son seul profit ; la lyse de la cellule marque la fin du processus, 12 heures après l'infection.
**2.** La protéine de 63 kDa est synthétisée sur les **ribosomes liés au réticulum endoplasmique rugueux**, point de départ de la voie de sécrétion qui, *via* l'appareil de Golgi, apporte aussi des protéines intrinsèques à la membrane plasmique. Les 4 autres protéines sont fabriquées grâce aux **ribosomes libres** du cytosol.
**3.** Cette protéine est ensuite **glycosylée** lors de son passage dans l'appareil de Golgi.
**4.** On peut utiliser le **microscope électronique** (coupes ultrafines conventionnelles) ou bien les microscopes photoniques dits **confocal, ou à déconvolution** (cf. fiche 13), qui permettent de réaliser des coupes optiques à travers cet épithélium.

# Liste des exercices

# Liste des techniques décrites

# Bibliographie

AIME-GENTY N., BUSSEREAU-PLUNIAN F., DUBERTRET G., *Problèmes corrigés de Biologie Cellulaire*, Dunod, Paris, 2002.

ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P., *Molecular Biology of the Cell,* 4$^{e}$ éd., Garland Science, 2002.

CALLEN J-C., *Biologie cellulaire ; des molécules aux organismes,* Dunod, 2005.

CALLEN J-C., CHARRET R., CLEROT J-C., *QCM et QROC de Biologie Cellulaire*, 2$^{e}$ éd., EdiScience, 2006.

COOPER G.M., *The Cell*, 2$^{e}$ éd., ASM Press - Sinauer Associates, 2000.

KARP G., *Cell and Molecular Biology*, 4$^{e}$ éd., John Wiley and Sons, 2005.

LODISH H., BERK A., MATSUDAIRA P., KAISER C.A., KRIEGER M., SCOTT M.P., ZIPURSKY S.L., DARNELL J.E., *Molecular Cell Biology*, 5$^{e}$ éd., W.H. Freeman and Co, New-York, 2004.

ROLAND J-C., CALLEN J-C., *Atlas de Biologie cellulaire,* 6$^{e}$ éd., Dunod, 2007.

# Illustrations

Tous les clichés présentés dans cet ouvrage sont originaux ou ont été extraits des ouvrages suivants : *Biologie cellulaire : des molécules aux organismes,* 2$^{e}$ éd., Dunod, Paris, 2005 ; *QCM et QROC de Biologie Cellulaire*, 2$^{e}$ éd., EdiScience, Paris, 2006 ; *Atlas de Biologie cellulaire,* 6$^{e}$ éd., Dunod, Paris, 2007.

# Remerciements

À l'occasion de la parution de cet ouvrage, fruit d'une longue expérience d'enseignement, je souhaite remercier sincèrement toute l'équipe des enseignants du Service de Biologie Cellulaire du L1 SV du Centre d'Orsay. Si tous les exercices présentés dans ces pages sont bien de mon cru, certains doivent beaucoup au travail d'équipe qui y a été effectué. Je dédie donc ce volume à tous mes collègues, ceux de la première heure comme ceux qui ont rejoint plus récemment ce groupe : Bussereau F., Charret R., Clérot J.-C., Deneubourg AM., Dupré S., Dutuit P., Grisvard J., Lemullois M., Orcival J., Thomas M., ainsi qu'à tous les ATER et moniteurs qui nous ont aidés.

# Index

EXPRESS SCIENCES




Jean-Claude CALLEN

# Biologie cellulaire
## en 30 fiches

**Des principes aux applications**

Comment aller à l'essentiel, comprendre les méthodes et les démarches avant de les mettre en application ?

Conçue pour faciliter aussi bien l'apprentissage que la révision, la collection « **EXPRESS** » vous propose une présentation simple et concise en **30 fiches pédagogiques** des notions de biologie cellulaire.

Chaque fiche comporte :

- les **idées** clés à connaître,
- la **méthode** à mettre en œuvre,
- les **applications** sous forme d'exercices corrigés.

**Jean-Claude Callen**
Maître de conférences à l'université Paris Sud-Orsay.

- **L1/L2 Sciences de la Vie et de la Terre**
- **PCEM 1**
- **PH1**

ISBN 978-2-10-054193-5




www.dunod.com